

Antioxidativ wirksame Verbindungen in Brombeerblättern, *Cistus incanus*, Himbeerblättern, Pfefferminze und anderen Kräuter- und Fruchteees

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Lebensmittelchemiker Olaf Pokorny
aus Hannover

1. Referent:	apl. Prof. Dr. U. H. Engelhardt
2. Referent:	Prof. Dr. P. Winterhalter
eingereicht am:	11. Oktober 2004
mündliche Prüfung (Disputation) am:	28. Januar 2005
Druckjahr:	2005

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Pokorny, O., Engelhardt, U. H.: *Antioxidatives Potenzial und Gesamtphenolgehalte von Kräuter- und Früchtetees*, Lebensmittelchemie 56, 2002, S. 77-78

Tagungsbeiträge

Pokorny, O., Engelhardt, U. H.: „Antioxidatives Potenzial und Gesamtphenolgehalte von Kräuter- und Früchtetees“ (Vortrag), 37. Arbeitstagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Kiel, 2002

Burmeister, A., Pokorny, O., Engelhardt, U. H.: „HPLC-Untersuchungen über antioxidativ wirksame Bestandteile ausgewählter Kräutertees“ (Vortrag), 38. Arbeitstagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Hamburg, 2003

Pokorny, O., Burmeister, A., Engelhardt, U. H.: „Antioxidativ wirksame Verbindungen in Kräuter- und Früchtetees“ (Poster), 32. Deutscher Lebensmittelchemikertag, München, 2003

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2001 bis Juli 2004 unter der Leitung von Herrn apl. Prof. Dr. U. H. Engelhardt am Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. U. H. Engelhardt danke ich ganz besonders für die Betreuung der Arbeit, für seine stete Diskussionsbereitschaft, die zahlreichen Vorschläge und Ideen sowie für den mir gewährten Freiraum bei der Umsetzung meiner Ziele. Das daraus resultierende Klima des Vertrauens hat sehr zum erfolgreichen Gelingen der Arbeit beigetragen. Herrn Prof. Dr. P. Winterhalter danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschung (AIF) und dem Forschungsbereich der Ernährungsindustrie (FEI) danke ich für die Finanzierung der Arbeit (AIF-FV: 12895N). Der Wirtschaftsvereinigung Kräuter- und Früchtetee e. V. (WKF), insbesondere Herrn Dr. Adolf Kler, danke ich für die Bereitstellung der untersuchten Proben und das Interesse am Fortgang der Arbeit.

Weiterhin möchte ich Ilona Brundiers, Heike Wünnecke und Stefanie Stoll für die im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeiten geleisteten Beiträge danken. Monika Messerer, Dr. Silke Hillebrand und Dr. Gerold Jerz danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren und die wertvollen Hilfestellungen bei deren Interpretation. Mein besonderer Dank gilt auch Frau Carola Balcke für ihren unermüdlichen Einsatz beim Korrekturlesen des Manuskripts.

Vor allem danke ich aber Beate Maiwald und Astrid Burmeister für die überaus angenehme, humorvolle und konstruktive Zusammenarbeit im Teelabor.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeines über Kräuter- und Früchtetees	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Wirtschaftliche Bedeutung	2
1.1.3	Sekundäre Pflanzenstoffe	4
1.1.4	Polyphenole	4
1.1.4.1	Nomenklatur	5
1.1.4.2	Flavonoide	6
1.1.4.3	Hydroxyzimtsäure-Verbindungen	7
1.1.4.4	Biosynthese	8
1.2	Problemstellung	11
2	Ergebnisse und Diskussion	13
2.1	Untersuchte Proben	13
2.2	Verwendete Methoden	14
2.2.1	Extraktion	14
2.2.2	Bestimmung der antioxidativen Aktivität	15
2.2.3	Bestimmung der Gesamtphenole	17
2.2.4	Reinigung der Extrakte zur Quantifizierung	18

2.2.4.1	Polyamid-Säulenchromatographie	18
2.2.4.2	Festphasenextraktion	19
2.2.5	Isolierung	19
2.2.5.1	XAD™-Säulenchromatographie	19
2.2.5.2	High-Speed Countercurrent Chromato- graphy	20
2.2.5.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ..	22
2.2.6	Quantifizierung und Strukturaufklärung	23
2.2.6.1	UV/Vis-Spektroskopie	23
2.2.6.2	Massenspektrometrie	24
2.2.6.3	Kernresonanzspektroskopie	26
2.3	Übersichtsuntersuchungen	28
2.3.1	Extrahierbare Feststoffe	28
2.3.2	Antioxidative Aktivität und Gesamtphenol- gehalte	29
2.4	Versuche zur Lagerstabilität	36
2.5	Extraktionsversuche	39
2.6	Brombeerblätter	41
2.6.1	Botanik der Brombeere	41
2.6.2	Inhaltsstoffe und Verwendung	43
2.6.3	Bisherige Untersuchungen an Brombeerblättern	43
2.6.4	Quantitative Bestimmungen	44

2.7	Cistus incanus	48
2.7.1	Botanik von Cistus incanus	48
2.7.2	Inhaltsstoffe und Verwendung	49
2.7.3	Bisherige Untersuchungen an Cistus incanus	49
2.7.4	Quantitative Bestimmungen	50
2.8	Himbeerblätter	53
2.8.1	Botanik der Himbeere	53
2.8.2	Inhaltsstoffe und Verwendung	55
2.8.3	Bisherige Untersuchungen an Himbeerblättern	55
2.8.4	Quantitative Bestimmungen	56
2.9	Pfefferminze	61
2.9.1	Botanik der Pfefferminze	61
2.9.2	Inhaltsstoffe und Verwendung	63
2.9.3	Bisherige Untersuchungen an Pfefferminze	63
2.9.4	Quantitative Bestimmungen	64
2.9.5	Isolierung und Identifizierung einzelner Inhaltsstoffe	69
2.9.5.1	Extraktion und Reinigung	69
2.9.5.2	Vorfractionierung des Extraktes mittels HSCCC	72
2.9.5.3	Semipräparative HPLC	73

3	Zusammenfassung	87
4	Experimenteller Teil	91
4.1	Material und Methoden	91
4.1.1	Chemikalien	91
4.1.2	Pflanzenmaterial	94
4.1.3	Geräte	94
4.1.3.1	Photometer	94
4.1.3.2	HSCCC-Anlage	94
4.1.3.3	Analytische HPLC – Diodenarray-Detektor	95
4.1.3.4	Semipräparative HPLC – UV/Vis-Detektor	95
4.1.3.5	HPLC-Massenspektrometer	96
4.1.3.6	Kernresonanzspektrometer	97
4.1.4	Standardmethoden	98
4.1.4.1	Haushaltsüblicher Teeaufguss	98
4.1.4.2	Extrahierbare Feststoffe	98
4.1.4.3	Methanolische Extraktion	98
4.1.4.4	Gesamtphenol-Bestimmung	99
4.1.4.5	Bestimmung der antioxidativen Kapazität ..	100
4.1.4.6	Extraktion zur Gewinnung von Rein- substanzen	102
4.1.4.7	Reinigung des Rohextraktes über Amber- lite™ XAD™-16HP	103

4.1.4.8	High-Speed Countercurrent Chromatography	103
4.1.4.9	Semipräparative HPLC	104
4.1.5	Standardarbeitsvorschriften	105
4.1.5.1	Trockenmasse	105
4.1.5.2	Bestimmung von Flavan-3-olen (Catechine)	105
4.1.5.3	Bestimmung von Rosmarinsäure	107
4.1.5.4	Bestimmung von Hydroxyzimtsäure- Derivaten (Chlorogensäuren)	108
4.1.5.5	Bestimmung von Flavon-, Flavanon- und Flavonol-O-glykosiden	112
4.1.5.6	Bestimmung von Flavon-C-glykosiden	115
4.2	Identifizierung der quantitativ bestimmten Verbindungen	119
4.2.1	Brombeerblätter	119
4.2.1.1	Hydroxyzimtsäurederivate	119
4.2.1.2	Flavonol-O-glykoside	120
4.2.1.3	Acide Flavonol-O-glykoside	121
4.2.2	Cistus incanus	122
4.2.2.1	Flavan-3-ole	122
4.2.2.2	Flavonol-O-glykoside	123
4.2.3	Himbeerblätter	124
4.2.3.1	Hydroxyzimtsäurederivate	124

4.2.3.2	Flavonol-O-glykoside	125
4.2.3.3	Acide Flavonol-O-glykoside	126
4.2.4	Pfefferminze	127
4.2.4.1	Hydroxyzimtsäurederivate	127
4.2.4.2	Rosmarinsäure	128
4.2.4.3	Flavon- und Flavanon-O-glykoside	129
4.2.4.4	Acide Flavon-O-glykoside	130
4.3	Spektroskopische Daten der isolierten Verbindungen	131
Literaturverzeichnis		137
Anhang		147

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonsäure)
br s	breites Singulett
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C	Catechin
CCC	Countercurrent Chromatography
CD ₃ OD	deutერიertes Methanol
CGA	Chlorogensäure
CouQA	p-Cumaroylchinasäureester
CQA	Caffeoylchinasäureester
d	Dublett
DAD	Diodenarray-Detektor
dd	doppeltes Dublett
δ	chemische Verschiebung in ppm
d. h.	das heißt
div.	diverse
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO-d ₆	deutერიertes Dimethylsulfoxid
DPPH	N,N-Diphenyl-N'-(2,4,6-trinitrophenyl)-hydrazyl
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechingallat

EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechingallat
EHIA	European Herbal Infusions Association
engl.	englisch
ESI	Elektrospray-Ionisation
e. V.	eingetragener Verein
EW	Einwaage
FCG	Flavon-C-glykoside
FOG	Flavonol-O-glykoside
FQA	Feruloylchinasäureester
GA	Gallussäure
GAE	Gallussäure-Äquivalente
geschn.	geschnitten
getr.	getrocknet
Glc	Glucose
GlcA	Glucuronsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSCCC	High-Speed Countercurrent Chromatography
i. D.	innerer Durchmesser
Int.	Intensität
ISO	International Organisation for Standardization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
J	Kopplungskonstante in Hz
konst.	konstant
λ	Wellenlänge

lat.	lateinisch
LDL	Low-density lipoprotein
m	Multiplett
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
MLCCC	Multi-Layer Coil Countercurrent Chromatography
mmol	Millimol
MS	Massenspektrometrie/Massenspektrum
M_r	relative Molekülmasse
m/z	Masse-Ladungszahl
nat.	natürlich (unbehandelt)
neg.	negativ
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
n. n.	nicht nachweisbar
ORAC	Oxygen Radical Absorbing Capacity
PA	Polyamid
p. A.	pro Analysis (zur Analyse)
pos.	positiv
ppm	parts per million
rel.	relativ
Rha	Rhamnose
RP	Reversed-Phase (Umkehrphase)
rpm	Rotationen pro Minute
RRF	relativer Responsefaktor
RT	retention time (Retentionszeit)

s	Singulett
SC	Säulenchromatographie
schw.	schwarz
s.	siehe
s. u.	siehe unten
TEAC	Trolox [®] -Equivalent Antioxidative Capacity
Temp.	Temperatur
TM	Trockenmasse
TPP	Total Polyphenolics (Gesamtphenolgehalt)
TSS	Total Soluble Solids (extrahierbare Feststoffe)
u. a.	unter anderem / und andere
UV/Vis	ultraviolette / sichtbares Licht
VF	Verdünnungsfaktor
vgl.	vergleiche
z. A.	zur Analyse
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Allgemeines über Kräuter- und Früchtetees

1.1.1 Definition

In den Leitsätzen für Tee, teeähnliche Erzeugnisse, deren Extrakte und Zubereitungen (Leitsätze, 1999) finden sich folgende Begriffsbestimmungen:

- **Tee** stammt ausschließlich aus Blättern, Blattknospen und zarten Stielen des Teestrauches *Camellia Sinensis* L. O. Kuntze aus der Familie der Teegewächse (Theaceen), die nach den üblichen Verfahren bearbeitet sind.
- **Aromatisierter Tee** ist Tee, dem zur Aromatisierung geruch- und/oder geschmackgebende Stoffe zugesetzt sind.
- **Teeähnliche Erzeugnisse** sind Pflanzenteile, die nicht vom Teestrauch stammen und die dazu bestimmt sind, in der Art wie Tee verwendet zu werden. Teeähnliche Erzeugnisse sind auch Mischungen von teeähnlichen Erzeugnissen mit Tee, die nicht unter den Begriff „aromatisierter Tee“ fallen.
- **Aromatisierte teeähnliche Erzeugnisse** sind teeähnliche Erzeugnisse, denen zur Aromatisierung geruch- und/oder geschmackgebende Stoffe zugesetzt sind.

Diesen Begriffsbestimmungen folgend, sind Kräuter- und Früchtetees somit in eine der Kategorien „teeähnliche Erzeugnisse“ oder „aroma-

tisierte teeähnliche Erzeugnisse“ einzuordnen. Eine Abgrenzung dieser als Lebensmittel in den Verkehr gebrachten Tees zu Arzneitees, die aufgrund ihrer pharmakologischen Wirkungen verwendet werden, wird diskutiert (vgl. WKF, 2000, Streit, 2001, ALS, 2002).

1.1.2 Wirtschaftliche Bedeutung

Kräuter- und Früchtetees erfreuen sich in Deutschland immer weiter wachsender Beliebtheit. Laut Marktbericht der Wirtschaftsvereinigung Kräuter- und Früchtetee e. V. wurden im Jahr 2003 insgesamt 36.950 Tonnen getrocknete Pflanzen oder Pflanzenteile verkauft, 2.964 Tonnen bzw. 8,7 % mehr, als im Jahr zuvor. Dies entspricht nach Zubereitung, auf der Basis von 3 g Tee pro Tasse, einem Konsum von über 900 Millionen Tassen Kräuter- und Früchtetee, die bundesweit zusätzlich getrunken wurden. Insgesamt liegt der Verbrauch somit bei über 12 Milliarden Tassen.

Kräuter- und Früchtetee-Mischungen gewannen mit 11,5 %, von 12.198 Tonnen im Jahr 2002 auf 13.601 Tonnen im Jahr 2003, überdurchschnittlich stark. Ihr Anteil am Gesamtumsatz beträgt etwa konstant rund 37 %. Der größte Absatz innerhalb der Teemischungen entfiel dabei auf die aromatisierten Sorten. Sie verzeichneten sogar einen Zuwachs um 16,3 % von 8.396 Tonnen im Jahr 2002 auf 9.761 Tonnen. Der Anteil an nicht-aromatisierten Mischungen stieg im gleichen Zeitraum leicht um 1,0 % und liegt mit + 38 Tonnen nun bei einem Absatz von 3.840 Tonnen.

Mit 23.349 Tonnen und einem Absatzplus von 7,2 % stellen die so genannten Monosorten, wie Kamille, Pfefferminze oder Rooibos, nach wie vor das größte Segment im Gesamtmarkt. Wie schon im Jahr zuvor ist der Rooibos wieder die Sorte mit der bedeutendsten Absatzsteigerung. 1.200 Tonnen oder 60 % wurden im Jahr 2003 zusätzlich verkauft. Den zweithöchsten Zuwachs verzeichnete eine einheimische Sorte: die Ka-

mille. Ihr Anteil stieg um 4,2 % auf mittlerweile 4.661 Tonnen. Auch der unangefochten beliebteste Kräutertee Deutschlands, die Pfefferminze, verzeichnete nach Verlusten im Vorjahr wieder einen Anstieg um 3,4 % auf 5.869 Tonnen.

Die Gewinne der anderen Sorten gingen 2003 zu Lasten von Fenchel (– 4,0 %) und der Mischung Hibiskus/Malve, die mit – 38 % Absatzrückgang einen sehr hohen Verlust verzeichnete.

Tabelle 1.1: Verkaufszahlen Kräuter- und Früchtetees in 2003; Quelle: WKF (2004)

Sorte	Absatz in Tonnen	vs. 2002
<i>Kräuter- und Früchtetee, gesamt</i>	36.950	+ 8,72%
<i>Kräuter- und Früchtetee, mono</i>	23.349	+ 7,16 %
Pfefferminze	5.869	+ 3,40 %
Kamille	4.661	+ 4,20 %
Hagebutte/Hibiskus	3.926	+ 3,10 %
Fenchel	3.574	- 4,00 %
Rooibos (Rotbusch)	3.200	+ 60,00 %
Hibiskus/Malve	525	- 37,94 %
Sonstige	1.594	- 26,31 %
<i>Kräuter- und Früchtetee-Mischungen</i>	13.601	+ 11,50 %
aromatisiert	9.761	+ 16,26 %
nicht-aromatisiert	3.840	+ 1,00 %

1.1.3 Sekundäre Pflanzenstoffe

Unter dem Begriff „sekundäre Pflanzenstoffe“ werden eine Reihe von ausschließlich in Pflanzen vorkommenden Substanzklassen zusammengefasst. Im Gegensatz zu Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten besitzen sie zwar keinen Nährwert, werden heute jedoch, im Hinblick auf ihre Bedeutung für die Gesundheit, zusammen mit Vitaminen, Mineral- und Ballaststoffen auf eine Stufe gestellt. Die Bezeichnung „sekundär“ ist darauf zurückzuführen, dass diese Stoffe im sekundären, also nicht direkt dem Wachstum dienenden, Stoffwechsel produziert werden. Sie verleihen den Pflanzen Aroma, Duft und Farbe, wirken als Schutz vor Umwelteinflüssen, Schädlingen und Krankheitserregern.

Bislang sind etwa 30.000 verschiedene sekundäre Pflanzenstoffe bekannt, 10.000 davon finden sich in für Menschen verwertbaren Lebensmitteln. Enthalten sind sie u. a. in Obst, Gemüse, Salat, Getreide, Hülsenfrüchten, Nüssen, Samen und Kräutern. Bei einer ausgewogenen Ernährung liegt die tägliche Aufnahme bei etwa 1,5 g, bei rein vegetarischer Kost auch noch deutlich darüber (Watzl und Leitzmann, 1999). Nach Scalbert und Williamson (2000) soll allein die Aufnahme an Polyphenolen (s. u.) durchschnittlich etwa 1 g pro Tag betragen.

Man unterscheidet folgende neun Gruppen sekundärer Pflanzenstoffe: Carotinoide, Glucosinolate, Phytoöstrogene, Phytosterine, Polyphenole, Protease-Inhibitoren, Saponine, Sulfide und Terpene (Watzl und Leitzmann, 1999), wobei einige Phytoöstrogene auch den Polyphenolen zugeordnet sind (z. B. Isoflavone).

1.1.4 Polyphenole

Im Hinblick auf gesundheitsfördernde Eigenschaften sind die Polyphenole besonders hervorzuheben. In älteren Lehrbüchern (z. B. Schormül-

ler, 1974) findet man noch den Begriff „Vitamin P“ (Permeabilitätsvitamin), mit dem einige dieser Substanzen, wie etwa Rutin, belegt wurden. Diese Bezeichnung geht auf eine Entdeckung von Szent-Györgyi aus dem Jahre 1936 zurück. Er beobachtete eine Verminderung der Permeabilität von Kapillargefäßen nach Gabe eines Extraktes aus Zitronensaft. Da Polyphenole jedoch kein echter Vitamincharakter zukommt, wird auf Vorschlag der IUPAC diese Bezeichnung heute nicht mehr verwendet. Dass Polyphenole dennoch eine überaus wichtige Rolle für die Gesundheit spielen, erkannten amerikanische Wissenschaftler Anfang der 90er Jahre. Sie beobachteten, dass Menschen, die viel Obst und Gemüse aßen, wesentlich seltener an bestimmten Krankheiten wie z. B. Krebs erkrankten als Personen, die wenig davon verzehrten. Das protektive Spektrum reicht von anticancerogenen, antimikrobiellen und immunstärkenden Wirkungen über entzündungshemmende, antiallergische und gefäßerweiternde Eigenschaften bis hin zu antioxidativer Aktivität. Diese beruht auf der Fähigkeit der Moleküle, freie Radikale einzufangen, zu stabilisieren und somit deren negative Auswirkungen auf verschiedenste Stoffwechselvorgänge zu verhindern (Miller, 1996).

Für die untersuchten Kräuter- und Früchtetees haben Polyphenole auch aufgrund ihrer guten bis sehr guten Wasserlöslichkeit besondere Bedeutung. Carotinoide, die ebenfalls für ihre antioxidative Aktivität bekannt sind, gehen aufgrund ihres lipophilen Charakters nur zu einem geringen Teil in den Tee-Aufguss über.

1.1.4.1 Nomenklatur

Der Begriff „Polyphenol“ wird in der Literatur uneinheitlich verwendet. In älteren Veröffentlichungen wurden oft Verbindungen mit zwei oder mehr phenolischen Hydroxyl- oder Phenolethergruppen als „Polyphenole“ bezeichnet. Einem Vorschlag von Clifford (1999) folgend, wird diese Bezeichnung heute auf Verbindungen beschränkt, die mindestens

zwei aromatische Ringe besitzen, von denen jeder mindestens eine Hydroxylgruppe trägt. Hydroxyzimtsäuren wie z. B. einfache Caffeoylechinasäuren (s. u.) und Hydroxybenzoesäuren, die bisher zu den Polyphenolen zählten, gehören demnach zu den „einfachen Phenolen“.

1.1.4.2 Flavonoide

Flavonoide haben die größte Bedeutung unter den Polyphenolen. Bisher wurden über 6.000 Substanzen isoliert und identifiziert. Ihr Name leitet sich von der gelblichen Färbung zahlreicher Verbindungen dieser Gruppe her (flavus = lat. „gelb“).

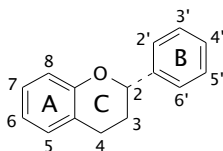


Abbildung 1.1: 2-Phenyl-chroman – Grundstruktur der Flavonoide

In Abbildung 1.1 ist die Grundstruktur der Flavonoide, das Flavan (2-Phenyl-chroman), ein häufig in der Natur anzutreffendes $C_6-C_3-C_6$ -Gerüst, dargestellt. Die Einteilung in die einzelnen Flavonoid-Klassen erfolgt nach dem Oxidationszustand des zentralen Pyranrings (C-Ring, vgl. Abbildung 1.3). Innerhalb der Klassen unterscheiden sich die Flavonoide in der Substitution der A- und B-Ringe. Hauptsubstituenten sind Hydroxylgruppen, die zum Teil mit Zuckern glykosidische Bindungen eingehen können. Daneben treten C-Alkylierungen an den A- und C-Ringen auf. Die Glykosidbildung erfolgt bevorzugt an den Hydroxylgruppen der C-Atome C3 (nur bei Flavonolen) und C7. Vergleichsweise häufig sind auch C-heterosidische Verknüpfungen, bevorzugt an den C-Atomen C6 und C8. Als Zuckerkomponenten kommen Monosaccharide (L-Arabinose, D-Galactose, D-Glucose, D-Glucuronsäure, D-Rham-

nose u. a.), Disaccharide (z. B. Rutinose = α -L-Rhamnosyl- β -D-glucose) und seltener Trisaccharide in Betracht.

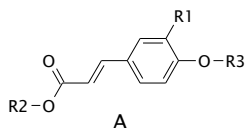
Sehr viele Flavonoid-Glykoside tragen Trivialnamen, die sich oft auf den Namen der Pflanze beziehen, aus der sie erstmals isoliert wurden. Da sich bald herausgestellt hat, dass der erste Fundort nicht charakteristisch für eine bestimmte Pflanzenart ist und nicht selten dieselben Glykoside im Pflanzenreich recht verbreitet auftreten, erschweren die Trivialnamen heute die Übersicht (Schneider und Hiller, 1999). Aufgrund der oft sehr komplexen IUPAC-Nomenklatur werden sie aber weiterhin verwendet.

1.1.4.3 Hydroxyzimtsäure-Verbindungen

Abbildung 1.2 zeigt die Grundstrukturen der wichtigsten Hydroxyzimtsäuren und deren Derivate. Dargestellt sind hier nur die trans-Isomere, aber auch cis-Isomere kommen vor. Die weit in der Natur verbreiteten Ester einer aliphatischen mit einer aromatischen Hydroxycarbonsäure werden als Depside bezeichnet (**B**). Bei der aliphatischen Hydroxycarbonsäure handelt es sich zumeist um L-(-)-Chinasäure, als aromatische Säuren kommen vor allem Kaffeesäure, Ferulasäure, p-Cumarsäure und gelegentlich Gallussäure vor (Herrmann, 1978). Hier dargestellt ist das 5-Isomer gemäß der IUPAC-Nomenklatur von 1976 (IUPAC, 1976). In älteren Publikationen wurde eine andere Zählweise verwendet, sodass dort die Positionen 3 und 5 vertauscht sind. Ebenso finden sich Ester mit zwei Hydroxycarbonsäuren, wie etwa die di-Caffeoylchinasäuren (3,4-diCQA; 3,5-diCQA; 4,5-diCQA). Etwas seltener sind Glykoside der Hydroxyzimtsäuren, bei denen eine glykosidische Bindung zwischen einem Zucker, meist D-Glucose, und einer der phenolischen Hydroxylgruppen vorliegt (**A**: R2 oder R3 = D-Glucose).

Der Begriff „Chlorogensäuren“ (CGA) hat in der Literatur keine einheitliche Bedeutung. In älteren Arbeiten wird er als Trivialname für die Caf-

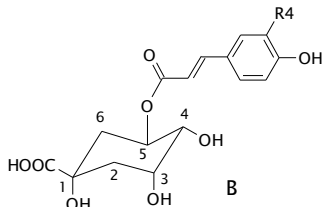
feoylchinasäureester (CQA) verwendet (5-CQA = „n-Chlorogensäure“, 3-CQA = „Neochlorogensäure“, 4-CQA = „Kryptochlorogensäure“). In dieser Arbeit werden darunter alle Hydroxyzimtsäure-Chinasäure-Ester zusammengefasst, wie es in aktuellen Publikationen üblich ist.



p-Cumarsäure (R1, R2, R3 = H)
Kaffeesäure (R1 = OH; R2, R3 = H)
Ferulasäure (R1 = OCH₃; R2, R3 = H)

p-Cumaroylglucose (R1, R3 = H; R2 = D-Glucose)
Caffeoylglucose (R1 = OH; R2 = D-Glucose; R3 = H)
Feruloylglucose (R1 = OCH₃; R2 = D-Glucose; R3 = H)

p-Cumarsäureglucosid (R1, R2 = H; R3 = D-Glucose)
Kaffeesäure-4-glucosid (R1 = OH; R2 = H; R3 = D-Glucose)
Ferulasäureglucosid (R1 = OCH₃; R2 = H; R3 = D-Glucose)



5-p-Cumaroyl-L-(-)-chinasäure (R4 = H)
5-Caffeoyl-L-(-)-chinasäure (R4 = OH)
5-Feruloyl-L-(-)-chinasäure (R4 = OCH₃)

Abbildung 1.2: Strukturformeln der wichtigsten Hydroxyzimtsäuren und -derivate

1.1.4.4 Biosynthese

Die Vorstufen der Polyphenole stammen aus dem Kohlenhydratstoffwechsel. In höheren Pflanzen werden zwei Synthesewege beschrritten: der Shikimisäure-Weg und der Polyketid-Weg (Acetat-Weg).

Ausgangspunkt des Shikimisäure-Weges ist die Kondensation von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat. Über mehrere Zwischenstufen, u. a. Shikimisäure, wird Phenylalanin gebildet (Metzner, 1973). Nach Desaminierung und anderen Folgereaktionen entsteht Zimtsäure, als Ausgangspunkt für die Bildung zahlreicher weiterer Phenole. Ebenfalls im Shikimisäure-Weg entsteht die weit verbreitete Chinasäure. Diese bildet durch Umsetzung mit Caffeoyl-CoA und anderen aktivierten aromatischen Hydroxycarbonsäuren Caffeoylchinasäureester und andere Depside (Gross, 1986).

Die Synthese der Flavonoide erfolgt durch eine Kombination von Shikimisäure- und Polyketid-Weg. Über eine stufenweise Kondensation von drei Malonyl-CoA-Einheiten mit der aktivierten p-Cumarsäure wird das 4,2',4',6'-Tetrahydroxychalcon (Naringeninchalcon) gebildet. Dieses stellt das C₁₅-Grundgerüst dar, von dem sich alle Flavonoide ableiten.

Abbildung 1.3 zeigt den Syntheseweg zur Bildung der verschiedenen Flavonoid-Klassen. Die beteiligten Enzyme sind in Tabelle 1.2 aufgeführt.

Tabelle 1.2: An der Biosynthese der Flavonoid-Klassen beteiligte Enzyme

Nr.	Enzym
<i>Vorstufen</i>	
I	Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL)
II	Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H)
III	4-Cumarat:CoA-Ligase (4CL)
IV	Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC)
<i>Flavonoid-Klassen</i>	
1	Chalkon-Synthase (CHS)
2	Chalkon-Isomerase (CHI)
3	2-Hydroxyisoflavanon-Synthase (2-HIS)
4	Flavon-Synthase (FNS)
5	(2S)-Flavon-3-Hydroxylase (F3H)
6	Flavonol-Synthase (FLS)
7	Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR)
8	Flavan-3,4- <i>cis</i> -diol-4-Reduktase

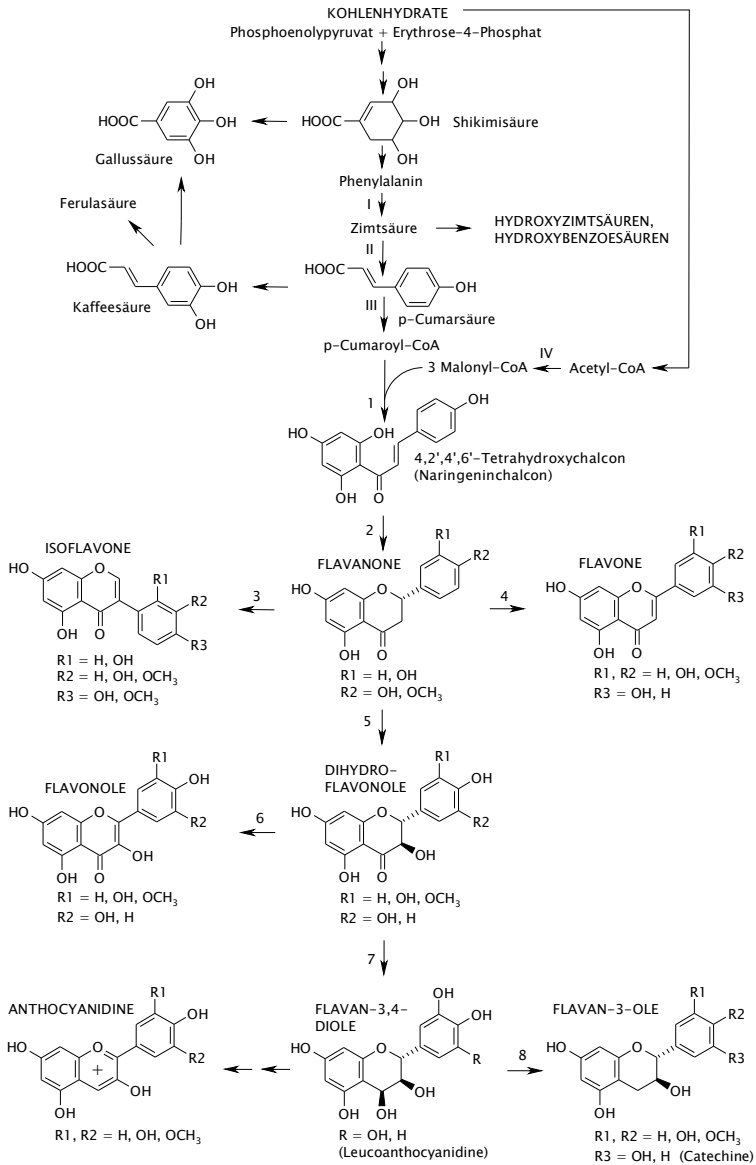


Abbildung 1.3: Biosynthese der Polyphenole nach Heller und Forkmann (1988)

1.2 Problemstellung

Über die antioxidativen Wirkungen pflanzlicher Lebensmittel, und die damit möglicherweise verbundenen positiven Effekte bei der Prävention chronischer Erkrankungen, existieren zahlreiche Veröffentlichungen in wissenschaftlichen und populären Medien (z. B. Crozier et al., 2000). Während über die Inhaltsstoffe von verschiedenen Getränken wie Rotwein (Waterhouse, 2002), Tee (Wiseman et al., 1997), Fruchtsäften, Kakao und Kaffee (z. B. Henn und Stehle, 1998) sowie einer Reihe weiterer Lebensmittel (Paganga et al., 1999), viele Untersuchungen durchgeführt worden sind, ist diese Fragestellung im Bereich der Kräuter- und Früchtetees bisher wenig bearbeitet worden. Hinsichtlich der Zusammensetzung der antioxidativ wirksamen Bestandteile dieser Produkte stellt sich die Datenlage ähnlich dar.

Ziel dieser Arbeit ist es, zunächst anhand von Übersichtsuntersuchungen, Daten über die antioxidative Wirksamkeit und die Gesamtphenolgehalte von Kräuter- und Früchtetees zu gewinnen. Von einigen wirtschaftlich bedeutsamen und aufgrund ihrer antioxidativen Aktivität interessanten Proben soll eine genauere Identifizierung, Quantifizierung und Isolierung einzelner Inhaltsstoffe vorgenommen werden. Weiterhin soll das Verhalten der Proben hinsichtlich ihrer antioxidativen Wirksamkeit während der Lagerung bei verschiedenen Lagerbedingungen untersucht werden. Um dem Verbraucher Informationen über die Zubereitung der Tees, im Hinblick auf einen möglichst hohen Stoffübergang der antioxidativ wirksamen Verbindungen in den Aufguss geben zu können, soll exemplarisch ermittelt werden, welche Temperaturen und Ziehzeiten hierfür die besten Ergebnisse liefern.

Bei den untersuchten Proben handelt es sich um Lebensmittel im Sinne der Leitsätze für Tee, teeähnliche Erzeugnisse, deren Extrakte und Zubereitungen. Produkte, die ausschließlich im pharmazeutischen Bereich eine Rolle spielen, sind somit ausdrücklich ausgenommen.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Untersuchte Proben

Die Übersichtsuntersuchungen zum Extraktgehalt, der antioxidativen Aktivität und dem Gesamtphenolgehalt wurden mit den in Tabelle 2.1 aufgelisteten 42 Teeproben durchgeführt. In der Regel handelte es sich dabei um Feinschnitte der jeweiligen Sorte, wie sie als lose oder abgepackte Ware, z. B. in Teebeuteln, in den Handel gelangen. Zur Verfügung gestellt wurden sie von Mitgliedsfirmen der Wirtschaftsvereinigung Kräuter- und Fruchttetee e. V. (WKV). Neben 40 Kräuter- und Fruchttetees wurde zum Vergleich jeweils ein grüner und ein schwarzer Tee untersucht.

Quantitative Bestimmungen wurden mit Brombeerblättern, *Cistus incanus*, Himbeerblättern und Pfefferminze durchgeführt. Aus Pfefferminze wurden darüber hinaus einzelne Substanzen isoliert und identifiziert.

Tabelle 2.1: Untersuchte Proben

01 Anis	15 Himbeerblätter	29 Rosmarinblätter
02 Apfel, sauer	16 Holunderbeeren	30 Rotes Weinlaub
03 Apfel, wild	17 Hopfenzapfen	31 Schwarztee
04 Aroniabeeren	18 Johannisbeeren, schw.	32 Silberlindenblüten
05 Brombeerblätter	19 Kamillenblüten	33 Sonnenhutkraut
06 Brombeerstücke	20 Lapachorinde	34 Süßholzwurzel, geschn.
07 Cistus incanus	21 Lindenblüten	35 Süßholzwurzel, nat.
08 Eisenkraut	22 Mateblätter, grün	36 Süßkraut
09 Fenchel	23 Melissenblätter	37 Taigawurzel
10 Ginkgoblätter	24 Orangenblätter	38 Weißdornblätter/-blüten
11 Ginsengwurzel	25 Orangenblüten	39 Zimt, Korinth
12 Grüntee	26 Orangenschalen	40 Zimtrinde
13 Hagebutte	27 Pfefferminze	41 Zitronengras
14 Hibiskus	28 Rooibos	42 Zitronenschalen

2.2 Verwendete Methoden

2.2.1 Extraktion

Zur Bestimmung der antioxidativ wirksamen Verbindungen mussten diese zunächst aus dem Pflanzenmaterial extrahiert werden. Je nach Ziel der Untersuchung wurden dabei unterschiedliche Verfahren eingesetzt.

Für die Messung der antioxidativen Aktivität und der Gesamtphenolgehalte im Teegetränk wurde eine rein wässrige, dem haushaltsüblichen Aufguss nachempfundene, Extraktion durchgeführt. Soll eine möglichst vollständige Extraktion erfolgen, so ist der Zusatz von Lösungsmitteln

unerlässlich. Zum Vergleich der Extrakte und für die quantitative Bestimmung der Catechine, Flavon- und Flavonolglykoside sowie der Chlorogensäuren hat sich 70 °C heißes, 70%iges wässriges Methanol bewährt (Clifford, 1985, Finger, 1991 und Kuhr, 1993). Dieses Lösungsmittelgemisch wird auch in der ISO-Norm ISO/CD 14502-1 zur Extraktion von grünem und schwarzem Tee verwendet.

Um einzelne Verbindungen isolieren zu können, ist eine Aufarbeitung in größerem Maßstab erforderlich. Damit die Extraktion sowohl möglichst vollständig als auch möglichst schonend verläuft, wurde ebenfalls mit 70%ig wässrigem Methanol extrahiert, die Temperatur jedoch auf 60 °C reduziert. Die Proben wurden unter diesen Bedingungen für eine Stunde unter Rühren extrahiert und anschließend filtriert.

2.2.2 Bestimmung der antioxidativen Aktivität

Rice-Evans et al. (1996) führen die antioxidative Aktivität der Flavonoide auf bestimmte Strukturmerkmale zurück. So kommt der o-dihydroxy „catechol“-Struktur am B-Ring eine wichtige Bedeutung zu. Der höhere TEAC-Wert von Quercetin (Flavonol) gegenüber Naringenin (Flavanon) bestätigt eine Steigerung der Aktivität durch eine C2–C3 Doppelbindung am C-Ring, die mit einer Carbonylgruppe an C4 konjugiert ist. Daneben ist das antioxidative Potenzial einer Verbindung abhängig von der Anzahl und der Position der Hydroxylgruppen. So ist die höhere antioxidative Aktivität von Quercetin gegenüber Rutin (Quercetin-3-O-glykosid) auf die zusätzliche Hydroxylgruppe am C-Ring zurückzuführen, die beim Glykosid durch den Zuckerrest blockiert ist. Dementsprechend zeigt sich bei den Flavanolen eine Steigerung der antioxidativen Aktivität mit zunehmender Anzahl an Hydroxylgruppen ($C \approx EC < EGC < ECG < EGCG$).

Zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität sind zahlreiche Testsysteme beschrieben. Sie basieren grundsätzlich auf der Erzeugung eines Radikals, das mit einer geeigneten Methode detektiert wird. Die wesentlichen Unterschiede liegen in der Art und Weise der Radikal-Erzeugung, in der Art des Radikals selbst und in der Methode der Detektion. Dabei besteht immer ein deutlicher Einfluss des Testmediums (hydrophil, lipophil) auf die antioxidative Wirksamkeit der untersuchten Komponenten. Häufig verwendete Messverfahren sind neben der ABTS-Methode auch die LDL-Oxidation, der DPPH- und der ORAC-Test.

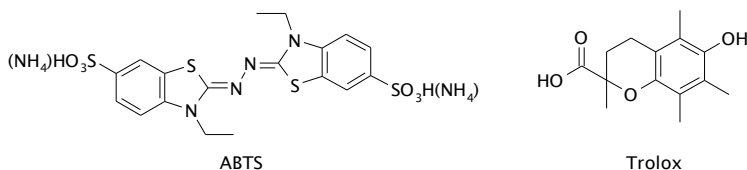


Abbildung 2.1: Strukturformeln von ABTS (2,2'-Azinobis-[3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonsäure]) und dem wasserlöslichen Vitamin E-Derivat „Trolox[®]“

Das Prinzip der ursprünglichen ABTS-Methode nach Miller et al. (1993) beruht auf der Verzögerung der linear ansteigenden Farbreaktion von Metmyoglobin und ABTS (2,2'-Azinobis-[3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonsäure]) bei Zugabe von Wasserstoffperoxid. Das bei der Reaktion entstehende relativ stabile ABTS^{•+}-Radikal besitzt eine grüne Farbe und wird photometrisch bei 734 nm bestimmt. In Anwesenheit von Antioxidantien, die als Wasserstoffdonatoren fungieren, wird die Radikalbildung gehemmt. Dies steht in direktem Zusammenhang mit der antioxidativen Aktivität der jeweiligen Verbindung. Als Bezugssubstanz wird das wasserlösliche Tocopherolderivat „Trolox[®]“ verwendet. Die gemessenen Werte werden als TEAC-Werte (Trolox[®] equivalent antioxidative capacity) in Bezug auf die Aktivität einer 1-millimolaren Trolox[®]-Lösung angegeben (Trolox[®] = 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-

carbonsäure). Je höher der TEAC-Wert einer Substanz ist, desto höher ist somit ihre antioxidative Kapazität (Rechner et al., 1997). Der Einsatz der ABTS-Methode zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität bietet folgende Vorteile: Da diese Methode in zahlreichen neueren Veröffentlichungen angewendet worden ist, ist ein Vergleich der ermittelten Werte mit denen von hier nicht untersuchten Substanzen und Extrakten möglich. Darüber hinaus zeichnet sich die Methode durch ihre einfache Durchführbarkeit aus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der ABTS-Test nach der modifizierten Methode von Re et al. (1999) ausgeführt. Hierbei wird zunächst das gefärbte Radikal durch Kaliumpersulfat erzeugt und anschließend mit dem zu messenden Extrakt versetzt. Gemessen wird die Entfärbung des Radikals, aufgrund der Reduktion durch das Antioxidans, zur ungefärbten Ausgangsverbindung. Die Methode wurde dabei an die untersuchten Matrices angepasst. Aufgrund der teilweise sehr geringen antioxidativen Aktivität einiger Produkte wurde die Probenmenge von 10 μL auf 20 μL verdoppelt. Die Kalibrierstandards wurden entsprechend nur halb so konzentriert angesetzt. Da bei einigen Proben offenbar Matrix-Effekte die Reaktion verzögern, wurde die Reaktionszeit von 6 auf 10 Minuten verlängert. Um eine Kontrolle über den korrekten Verlauf der Reaktion zu erhalten, wurde bei jeder Messreihe ein Ascorbinsäure-Standard, dessen TEAC-Wert aus der Literatur bekannt ist, mit vermessen.

2.2.3 Bestimmung der Gesamtphenole

Die Bestimmung der Gesamtphenole erfolgte mittels Folin-Ciocalteu-Test. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Reduktionskraft phenolischer Verbindungen. Leicht oxidierbare Stoffe, wie Polyphenole oder Ascorbinsäure, können im alkalischen Milieu aus Wolframat- und Molybdat-Ionen mit Phosphorsäure gebildete Komplexe zu blauen Farbpigmenten reduzieren. Die Intensität der entstehenden Färbung ist pro-

portional zum Gehalt an oxidierbaren Stoffen und wird photometrisch bestimmt. Zur Messung wurde eine Modifikation der Methode von Singleton und Rossi (1965) und Singleton et al. (1999) eingesetzt, die derzeit für Tee international genormt wird (ISO/CD 14502-1).

Verschiedene phenolische Verbindungen reagieren mit den Metall-Komplexen mit unterschiedlicher Empfindlichkeit. Die Reaktivität einer Verbindung steigt dabei annähernd proportional mit der Anzahl freier phenolischer Hydroxylgruppen, wobei zwei zueinander in ortho- oder para-Stellung stehende OH-Gruppen die Reaktivität noch erhöhen. Entsprechende strukturelle Merkmale werden auch für die antioxidative Wirkung von Polyphenolen verantwortlich gemacht.

2.2.4 Reinigung der Extrakte zur Quantifizierung

Liegen die zu untersuchenden Verbindungen in hohen Konzentrationen vor, kann auf eine weitere Aufreinigung der Extrakte verzichtet werden. Zur Bestimmung von Minorkomponenten, oder wenn Matrix-Effekte mit anderen Probenbestandteilen zu erwarten sind, ist jedoch eine selektive Anreicherung erforderlich.

2.2.4.1 Polyamid-Säulenchromatographie

Ein geeignetes Verfahren zur Anreicherung von Polyphenolen ist die Polyamid-Säulenchromatographie. Die Adsorption beruht auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den phenolischen Hydroxyl- aber auch Carboxylfunktionen mit den Carbonyl- und Amidgruppen des Polyamids (Hörhammer und Wagner, 1959). In einem Waschschrift werden zunächst alle wasserlöslichen Stoffe wie Zucker, Säuren und Alkaloide von den Polyphenolen getrennt. Catechine, Flavon- und Flavonolglykoside werden dann mit Methanol eluiert. Im Eluat können Flavonol-Oglykoside (FOG) direkt per HPLC bestimmt werden. Flavon-C-glykoside

müssen, wenn sie in wesentlich geringeren Konzentrationen vorliegen, nach enzymatischer Hydrolyse der FOG und Abtrennung der Aglyka über eine zweite Polyamid-Säule aufgereinigt werden (Engelhardt et al., 1992 und 1993). Flavonolglucuronide werden aufgrund der Säurefunktion im Zuckerrest stärker am Polyamid retardiert. Sie lassen sich durch ammoniakalisches Methanol eluieren (Degenhardt et al., 2004).

2.2.4.2 Festphasenextraktion

Zur quantitativen Bestimmung von Hydroxyzimtsäureestern hat sich die Festphasenextraktion an RP-18 Kartuschen bewährt (Engelhardt et al., 1989). Neben den Hydroxyzimtsäuren werden aber z. B. auch Catechine am RP-18 adsorbiert. Die Folge ist eine geringere Selektivität und aufgrund der Größe der Kartuschen auch eine geringere Kapazität gegenüber der Polyamid-Säulenchromatographie.

2.2.5 Isolierung

2.2.5.1 XAD™-Säulenchromatographie

Für die Isolierung einzelner Verbindungen kommt eine Aufreinigung der Extrakte an Polyamid oder über Festphasenextraktion an RP-18 Kartuschen aufgrund der hohen Kosten bzw. der geringen Kapazität nicht infrage. Da große Extraktmengen aufgearbeitet werden müssen, ist es sinnvoll, ein Säulenmaterial zu verwenden, dass nach Probenaufgabe und anschließender Elution nahezu vollständig gereinigt und wiederverwendet werden kann. Besondere Bedeutung kommt hier dem aromatischen, nicht-ionischen Polystyrol-Harz Amberlite™ XAD™-16HP zu, da dieses neben seinen ausgezeichneten Trenneigenschaften aufgrund seiner hohen Oberfläche von ca. 800 m²/g auch für die Herstellung von Lebensmitteln zugelassen ist.

Zur Reinigung und Vorfraktionierung des Rohextraktes wird der in Wasser gelöste gefriergetrocknete Extrakt auf die mit Wasser vorkonditionierte XADTM-Säule aufgegeben, mit Wasser gewaschen und dann mit 70%igem Methanol eluiert. Nach anschließendem erneutem Konditionieren mit Wasser ist das Säulenmaterial für die nächste Probenaufgabe vorbereitet.

2.2.5.2 High-Speed Countercurrent Chromatography

Im Anschluss an die Reinigung über XADTM-16HP bietet es sich an, mit dem methanolischen Eluat eine weitere Vorfraktionierung des noch sehr komplexen Substanzgemisches durchzuführen. Hier hat sich in letzter Zeit eine sehr leistungsfähige Form der Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie etabliert – die „Multi-Layer Coil Countercurrent Chromatography“ (MLCCC) und als Weiterentwicklung die „High Speed Countercurrent Chromatography“ (HSCCC) (z. B. Degenhardt et al., 2000).

Der Vorteil dieser gegenstromverteilungschromatographischen Methoden liegt darin, dass sie ohne feste stationäre Phase auskommen. Die Gefahr einer Artefaktbildung im Verlauf einer Trennung von Naturstoffgemischen, wie sie häufig bei festen Phasenmaterialien zu beobachten ist, wird dadurch vermieden. Darüber hinaus kann das eingesetzte Probenmaterial vollständig zurückgewonnen werden, da keine irreversiblen Adsorptionen an der stationären Phase möglich sind. Ein weiterer großer Vorteil ist, dass bei der HSCCC pro Lauf bis zu einem Gramm Substanz aufgetrennt werden kann.

Die Trennung eines Stoffgemisches erfolgt bei der Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie durch eine multiplikative Verteilung der Substanzen zwischen zwei nicht miteinander mischbaren flüssigen Phasen. Es gilt das Nernst'sche Verteilungsgesetz:

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

mit

K = Verteilungskoeffizient

C_s = Konzentration des gelösten Stoffes in der stationären Phase

C_m = Konzentration des gelösten Stoffes in der mobilen Phase

Die Güte einer Trennung ist somit von der Wahl der beiden Phasen abhängig. In einem geeigneten Zweiphasensystem liegen die Verteilungskoeffizienten der zu trennenden Substanzen im Bereich von 0,1 bis 10. Zur Auswahl geeigneter Systeme finden sich einige Strategien bei Oka et al. (1991) und Abbott und Kleiman (1991).

Die Auflösung R_s zweier Substanzen in einem Stoffgemisch folgt der auch aus der HPLC bekannten Beziehung:

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot (\alpha - 1) \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{k'}{1 + k'}$$

mit

α = Selektivitätsfaktor

N = Anzahl theoretischer Trennstufen

k' = Kapazitätsfaktor = $K \cdot V_s / V_m$

V_s = Volumen der stationären Phase

V_m = Volumen der mobilen Phase

Ersetzt man in der Gleichung den Kapazitätsfaktor k' , ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot (\alpha - 1) \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{K}{\left(V_m / V_s \right) + K}$$

Der Einfluss von α , N und dem Verteilungskoeffizienten K auf die Auflösung zweier Peaks ist so besser ersichtlich. Je größer diese Werte sind, desto besser ist die Auflösung. Ebenfalls ersichtlich ist der Einfluss des Volumenverhältnisses von mobiler zu stationärer Phase. Da bei der CCC ein großes Volumen an stationärer Phase zum Einsatz kommt, ist der Quotient (V_m/V_s) viel kleiner (0,1 bis 1,0) als bei der präparativen HPLC (ca. 15 – 20). Durch die Beeinflussung von V_s (und damit von V_m , da $V_s + V_m = \text{konst.}$) lässt sich somit der Kapazitätsfaktor k' direkt beeinflussen. Dadurch erklärt sich auch, warum mit Hilfe der CCC oft gute Trennungen erzielt werden, obwohl die Trennleistung nur wenig mehr als 1000 theoretische Böden (N) beträgt (Conway, 1990).

Der Aufbau einer HSCCC-Anlage gleicht im wesentlichen dem einer HPLC-Anlage. Sie besteht aus einer Pumpe, einem Injektionsventil mit einer Probenschleife, der Trenneinrichtung, einem Detektor und gegebenenfalls einem Fraktionssammler. Bei der Trenneinrichtung im Falle der HSCCC handelt es sich um den so genannten „Coil“, einen einfachen Teflonschlauch, der in mehreren Lagen auf insgesamt drei Spulen aufgewickelt ist. Während der Trennung werden diese Spulen in Rotation um ihre eigene, sowie in Form eines Planetengetriebes, um eine zweite, zentrale Achse versetzt, wodurch die stationäre Phase auf dem Coil gehalten wird. Die mobile Phase wird analog der HPLC durch die Trenneinrichtung gepumpt. Aufgrund der dezentralen Anordnung des Coils wirken im Verlauf der Bahnbewegung ständig wechselnde Zentrifugalkräfte. Dies führt zu einer kontinuierlichen Mischung und Entmischung der beiden Phasen und damit zu sehr vielen Ausschüttelschritten. Das Prinzip der HSCCC ist detailliert bei Ito (1996) beschrieben.

2.2.5.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die endgültige Isolierung einzelner Verbindungen erfolgte über semi-präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Für die Auftrennung der mittel- bis hochpolaren Polyphenole wurden verschiede-

dene RP-18-Materialien verwendet. Um mögliche Dissoziationen zurückzudrängen, kamen als Fließmittel 2%ige Essigsäure/Acetonitril-Mischungen zum Einsatz.

2.2.6 Quantifizierung und Strukturaufklärung

2.2.6.1 UV/Vis-Spektroskopie

Die quantitativen Bestimmungen der Flavan-3-ole (Catechine), Hydroxyzimtsäure-Derivate (Chlorogensäuren), Flavon-, Flavanon- und Flavonol-O-glykoside (FOG) sowie der Flavon-C-glykoside (FCG) wurden an einer HPLC-Anlage mit Diodenarray-Detektor (DAD) durchgeführt.

Der Vorteil der Messung mittels DAD liegt in der parallelen Aufzeichnung von UV/Vis-Spektren. Diese ermöglichen erste Hinweise auf bestimmte Strukturmerkmale und können zur Charakterisierung der getrennten Verbindungen herangezogen werden.

Die Zuordnung der Peaks erfolgte zum Teil mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Standardsubstanzen, die auch zur Kalibrierung verwendet wurden. Bei glykosidischen Verbindungen wie FOG und FCG konnten hier jedoch nur die Aglyka zugeordnet werden, die Bestimmung der jeweiligen Zucker-Reste erfolgte, soweit möglich, anhand von Massenspektren.

Wie bei der Isolierung einzelner Verbindungen, wurden die Trennungen an verschiedenen RP-18-Säulen durchgeführt, als Fließmittel wurden ebenfalls 2%ige Essigsäure/Acetonitril-Mischungen verwendet.

2.2.6.2 Massenspektrometrie

Um die mit Hilfe der HPLC-DAD getrennten Verbindungen genauer identifizieren und schließlich quantifizieren zu können, ist eine weitergehende Strukturaufklärung, speziell der Zucker-Komponenten glykosidischer Verbindungen, notwendig. Als Methode der Wahl hat sich hier die Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie bewährt. Auf diese Weise können dieselben chromatographischen Bedingungen direkt übertragen werden, wodurch eine Zuordnung der einzelnen Peaks neben den erhaltenen Strukturinformationen zusätzlich über die Retentionszeit möglich ist.

Die Reinheit isolierter Verbindungen kann ebenfalls hervorragend über die Massenspektrometrie überprüft werden, da auch nicht UV-aktive Substanzen detektiert werden. Gleichzeitig erhält man über die Massenspektren und die Fragmentierungsmuster wertvolle Strukturinformationen.

Ein besonders leistungsfähiges Kopplungsverfahren stellt die Elektrospray-Ionisation (ESI) dar. Die Ionen werden dabei besonders schonend unter Atmosphärendruck gebildet und über ein Transfer- und Fokussierungssystem in das Hochvakuumssystem des Massenspektrometers geleitet. Bei dieser sanften Ionisierungstechnik werden die Analyten nur minimal thermisch belastet, sodass diese meist ohne zu fragmentieren in die Analyse-Einheit des Massenspektrometers gelangen und die Molekülmassen direkt bestimmt werden können. Verwendet wurde ein Esquire-LC der Firma Bruker Daltonik GmbH, Bremen. Abbildung 2.2 zeigt schematisch den Aufbau der Elektrospray-Ionenquelle.

Das Fließmittel mit den gelösten Analyten gelangt über den Nebulizer in die Sprühkammer. Gegenüber anderen Ionisierungsverfahren steht der Probeneinlass hier im rechten Winkel zur Glaskapillare, dem Eingang zum Massenspektrometer. Diese Anordnung verringert die Belastung

des Hochvakuums durch Lösungsmittelreste und nicht ionisierte bzw. nicht ionisierbare Moleküle auf ein Minimum. Durch Aufheizen der Sprühkammer auf Temperaturen über 300 °C und die Einleitung eines ebenfalls über 300 °C heißen Trocknungsgases (Stickstoff) verdampft das Lösungsmittel. Es kommt zu so genannten „Coulomb-Explosionen“, wodurch gasförmige Substanzen gebildet werden.

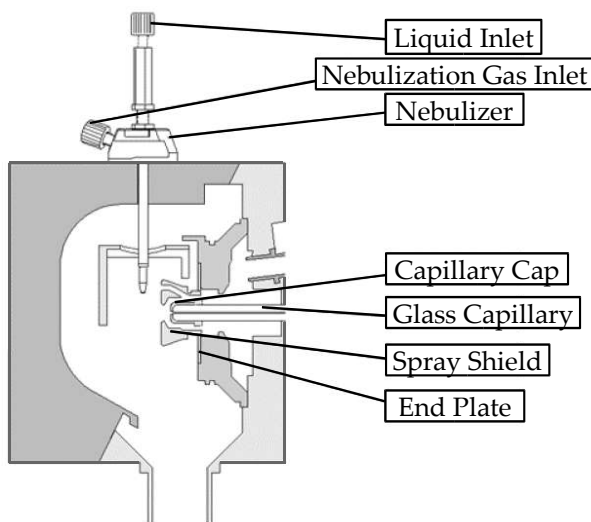


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau der ESI-Ionenquelle des Bruker Esquire-LC (Bruker Daltonik GmbH, Bremen)

Die untersuchten Polyphenole lassen sich vergleichsweise leicht deprotonieren, d. h. sie bilden bevorzugt negativ geladene Ionen. Aus diesem Grund wurden die meisten Messungen im negativen Modus durchgeführt. Die beiden metallischen Enden der Kapillare liegen dabei auf Potenzial und zwar im Bereich von etwa +2000 bis +5000 V gegenüber dem Nebulizer und einer Differenz von 500 V relativ zur End Plate. Der so erzeugte elektrostatische Gradient unterstützt die Bildung negativ geladener Ionen und sorgt dafür, dass nur diese angezogen und mit Hilfe

des Druckgradienten zwischen Sprühkammer (1013 mbar) und erster Vakuumstufe (2 mbar) durch die Kapillare transportiert werden. Im Bereich der folgenden Fokussierungseinrichtungen wird das Trocknungsgas vollständig entfernt, sodass schließlich nur noch die Ionen in den Analysator gelangen. Zur Identifizierung isolierter Verbindungen wurden diese zum Teil auch noch im positiven Modus gemessen. Dazu müssen die angelegten Spannungspotenziale zwischen Nebulizer und End Plate lediglich in ihrer Polarität vertauscht werden, sodass die Bildung und Weiterleitung positiv geladener Ionen unterstützt wird.

Als massensensitiver Detektor wurde eine Ionenfalle (Ion-Trap) verwendet. Diese ermöglicht es, Multistage-MS-Spektren (MS^n) aufzuzeichnen. In mehreren Stufen hintereinander können so definierte Molekülmassen isoliert, gezielt fragmentiert und analysiert werden. Dabei wird jeweils das Pseudomolekülion $[M - H]^+$ im negativen Modus oder $[M + H]^+$ bzw. $[M + Na]^+$ im positiven Modus eines zu bestimmenden Analyten in der Ionenfalle angereichert und fragmentiert, das Hauptfragment wieder isoliert, erneut fragmentiert usw. Das Fragmentierungsmuster gibt Aufschluss über strukturelle Merkmale des Moleküls.

2.2.6.3 Kernresonanzspektroskopie

Zur endgültigen Strukturaufklärung einiger unbekannter Verbindungen wurden nach deren Isolierung 1H und bei ausreichender Konzentration ^{13}C -Spektren aufgenommen. Die Lage der Signale in den Spektren und die Kopplungskonstanten im 1H -Spektrum zwischen Signalen benachbarter Protonen lassen Rückschlüsse auf strukturelle Merkmale zu. Die Theorie der NMR-Spektroskopie wird ausführlich von Derome (1988) und Friebolin (1988) beschrieben.

Für die isolierten Verbindungen lag das Hauptinteresse bei der Kernresonanzspektroskopie in der Aufklärung der Zucker-Bausteine. Daher

soll hier kurz allgemein auf die typischen Signale eingegangen werden, die auch auf die Art der Verknüpfung von Zucker und Aglykon sowie die Position der Bindung schließen lassen. Eine ausführliche Beschreibung findet sich bei Agrawal (1992).

Zuckerhaltige Verbindungen zeigen im ^1H -Spektrum eine charakteristische Häufung von Signalen im Bereich von 3,0 bis 6,0 ppm. Diese stammen von den Resonanzen der Carbinolprotonen und sind zumeist stark überlagert, was häufig eine eindeutige Interpretation erschwert. Die als Dubletts erscheinenden Signale der anomeren Protonen sind am weitesten tieffeld-verschoben. Bei Kenntnis des Zuckers ermöglicht die Größe der Kopplungskonstante eine Bestimmung der Art der glykosidischen Bindung. Eine große Kopplung von 8 Hz deutet z. B. auf eine transdiaxiale Stellung des anomeren Protons H1 zu H2 hin. Bei Zuckern wie Glucose, Galactose oder Xylose lässt dies auf eine β -glykosidische Bindung schließen (δ 4,4 – 4,8 ppm), kleine Kopplungen von 1 bis 4 Hz sind dagegen typisch für ein äquatorial angeordnetes anomeres Proton, also eine α -glykosidische Bindung (δ 4,8 – 5,3 ppm). Bei einer Esterbindung sind diese Resonanzen noch einmal um 1 ppm tieffeld-verschoben. Die Signale der geminalen Protonen (bei Hexosen an C6) lassen sich ebenfalls meist eindeutig zuordnen. Die Gesamtstruktur des Zuckers lässt sich aufgrund der relativen Stellung der Protonen zueinander ebenfalls anhand der Kopplungskonstanten zwischen den entsprechenden Resonanzen ableiten.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum finden sich die Resonanzen der Carbinolkohlenstoffatome im Bereich von 70 bis 85 ppm. Aufgrund der Nachbarschaft von zwei Sauerstoffatomen ist das Kohlenstoffatom C1 dabei stärker entschirmt, das Signal somit weiter ins Tieffeld in den Bereich zwischen 90 und 112 ppm verschoben. Eine Esterbindung bewirkt im Gegensatz zum ^1H -Spektrum eine Verschiebung des anomeren Kohlenstoffatoms ins höhere Feld. Bei einer C-glykosidischen Bindung ist nur noch ein benach-

bartes Sauerstoffatom vorhanden, was ebenfalls einen Shift der entsprechenden Resonanz ins höhere Feld bewirkt (70 – 80 ppm). Die Signale der unsubstituierten Methylen-Kohlenstoffatome liegen zwischen 57,7 und 64,7 ppm.

Auch die Kohlenstoff- und Protonenresonanzen des Aglykons an der Bindungsstelle und in unmittelbarer Nähe werden von einer Glykosylierung beeinflusst. Aus den Shifts der entsprechenden Signale lässt sich die Position der Bindung ermitteln. So sind die Protonenresonanzen direkt am bindenden C-Atom, bzw. zu diesem vicinal stehende, zu tieferem Feld hin verschoben, während andere kaum beeinflusst werden. Glykosylierte Kohlenstoffatome zeigen einen Tieffeldshift von 4 bis 10 ppm, benachbarte werden meist etwas zu höherem Feld hin verschoben. Die Signale der Carboxylgruppe einer Esterbindung sind durch einen Hochfeldshift von ca. 2 bis 5 ppm gekennzeichnet, für benachbarte Kohlenstoffatome beobachtet man einen Tieffeldshift von 0,5 bis 2 ppm.

2.3 Übersichtsuntersuchungen

2.3.1 Extrahierbare Feststoffe

Die Menge an extrahierbaren Feststoffen dient als Bezugsgröße, damit die antioxidative Aktivität und die Gesamtphenolgehalte nicht ausschließlich auf die Einwaage bezogen werden müssen. Auf diese Weise kann auch festgestellt werden, welcher Extrakt eine hohe antioxidative Aktivität und einen hohen Gesamtphenolgehalt besitzt.

In Abbildung 2.3 sind die Extraktgehalte der 42 Teeproben in g/L bezogen auf 10 g Einwaage in 1 L Wasser (2 g/200 mL) bei einer Ziehzeit von 10 Minuten dargestellt. Die genauen Daten finden sich im Anhang in Tabelle A.I.1.

Der höchste Extraktgehalt mit ca. 10 g/L (entspricht 100 %) bei den Brombeerstücken ist darauf zurückzuführen, dass es sich hierbei bereits um einen gefriergetrockneten Extrakt handelt. Bei allen anderen Proben liegen die Gehalte zwischen 0,3 und 6,3 g/L (3 bis 63 %). Beeren und Früchte zeigen aufgrund der fruchteigenen Zucker die höchsten Extraktmengen. Mittlere Gehalte finden sich hauptsächlich bei Blatt- und Blütentees, wie z. B. bei Brombeerblättern und Pfefferminze, aber auch bei schwarzem und grünem Tee. Geringe Mengen an Extrakt liefern Sorten, die aus Rinden, Samen oder Wurzeln bestehen wie z. B. Fenchel, Rooibos oder Zimt.

2.3.2 Antioxidative Aktivität und Gesamtphenolgehalte

Abbildung 2.4 zeigt die antioxidativen Aktivitäten und die Gesamtphenolgehalte der wässrigen Aufgüsse, angegeben als Trolox[®]- bzw. Gallussäure-Äquivalente. Zur besseren Vergleichbarkeit sind letztere in g/10 g Einwaage dargestellt, werden im Text aber in Prozent (Faktor 10) angegeben. Die Sortierung der Proben richtet sich nach der antioxidativen Aktivität. In Tabelle A.II.1 im Anhang finden sich auch die exakten Daten der methanolischen Extrakte, auf deren Darstellung hier verzichtet wurde.

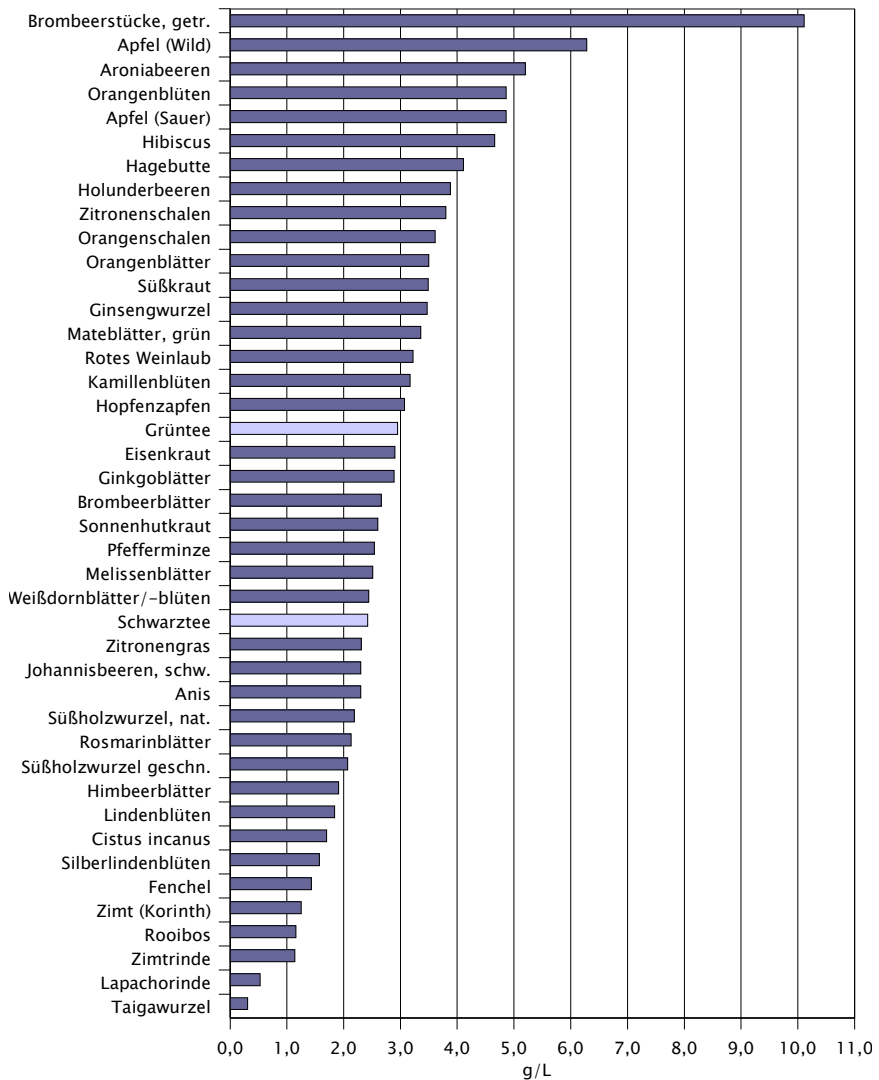


Abbildung 2.3: Extrahierbare Feststoffe (10 g Probe/L Wasser, 10 min Ziehzeit)

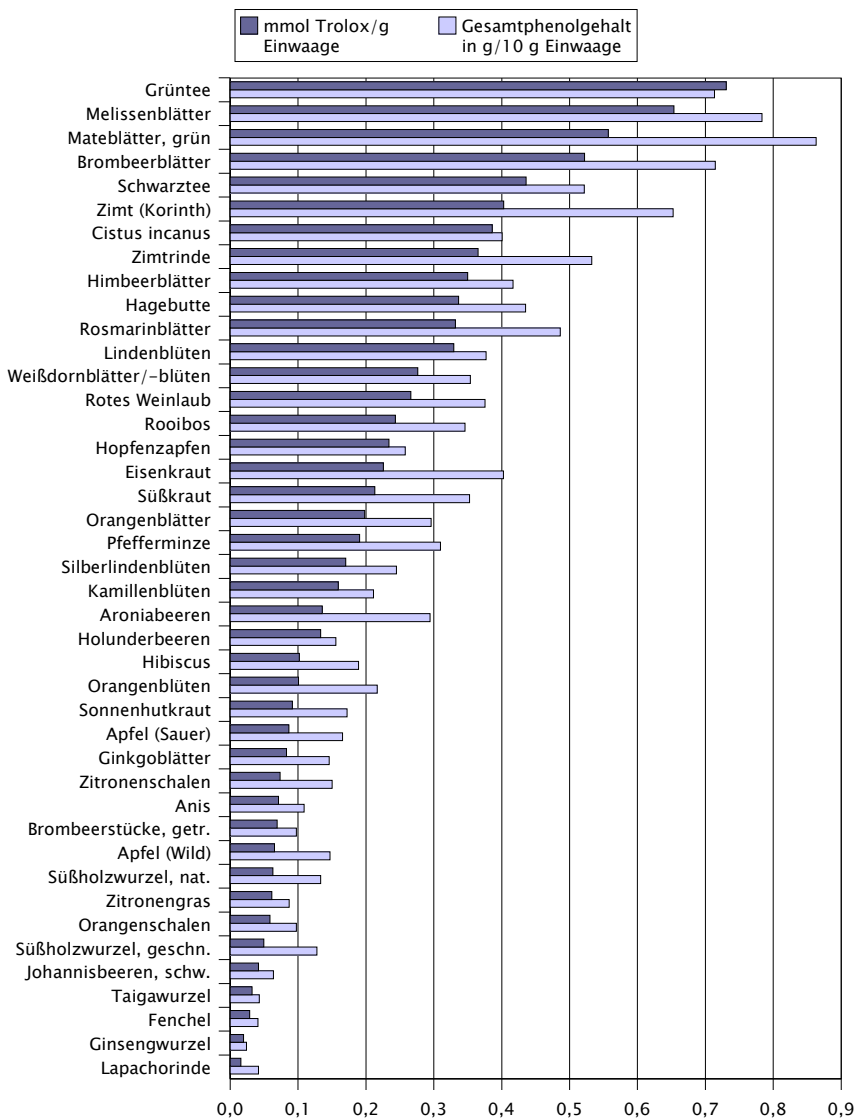


Abbildung 2.4: Antioxidative Aktivität und Gesamtphenolgehalte (als Gallussäure-Äquivalente) der wässrigen Extrakte

Sowohl die antioxidative Aktivität als auch die Gesamtphenolgehalte der methanolischen Extrakte liegen erwartungsgemäß meist deutlich über denen der wässrigen Extrakte. Besonders hoch sind die Unterschiede bei Zimt, Cistus incanus und Rooibos, also bei Proben, die hauptsächlich aus holzigem Material bestehen. Zurückzuführen ist dies auf das Mahlen der Proben vor der Extraktion und der damit verbundenen Oberflächenvergrößerung sowie auf die besseren Lösungseigenschaften des 70%igen Methanols.

Die Grafik zeigt, dass die antioxidative Aktivität und die Gesamtphenolgehalte in etwa korrelieren, auch wenn keine völlig lineare Abhängigkeit zu erkennen ist. Da beide Messmethoden unterschiedliche Eigenschaften der Analyten zur Bestimmung ausnutzen, war dies auch nicht anders zu erwarten. Allgemein lässt sich aber feststellen, dass Proben mit einem hohen Gehalt an Phenolen auch eine hohe antioxidative Aktivität zeigen und umgekehrt.

Die größte antioxidative Aktivität besitzt der Grüntee mit 0,73 mmol Trolox[®]/g Einwaage. Es folgen dann zunächst Blattsorten wie Mate, Melissenblätter, Brombeerblätter und Schwarztee, im Mittelfeld finden sich viele Frucht- und Blütensorten wie Lindenblüten, Aronia- und Hoslunderbeeren, Hibiscus und Kamillenblüten. Geringe antioxidative Aktivität zeigen vor allem die Rinden-, Samen- und Wurzelsorten, z. B. Anis, Fenchel, Lapachorinde und Ginsengwurzel.

Bezieht man die gemessenen Werte nicht auf den Aufguss, also auf die Einwaage, sondern auf den Gehalt an extrahierbaren Feststoffen, so erhält man eine Aussage über die Wirksamkeit der einzelnen Extrakte. Abbildung 2.5 stellt die Ergebnisse grafisch dar, die genauen Werte finden sich im Anhang in Tabelle A.III.1.

Hier zeigt sich ein etwas verändertes Bild. Die beiden Zimt-Sorten (Korinath und Zimtrinde) liegen mit jeweils 3,2 mmol Trolox[®]/g Extrakt und einem Phenolgehalt von ca. 50 % deutlich in Führung. Zwar liefern sie nur sehr wenig Extrakt (1,25 bzw. 1,14 g/L), dieser ist aber antioxidativ sehr wirksam. Hohe Gehalte an Phenolcarbonsäuren (u. a. Protocatechusäure, div. Hydroxyzimtsäuren) und kondensierten Tanninen (oligomere Procyanidine) sind als Ursache dafür anzusehen (Wichtl, 2002).

Im Mittelfeld finden sich wieder die meisten Blatt- und Blütentees wie z. B. Brombeerblätter, Pfefferminze und Lindenblüten. Bei diesen Sorten ist das Verhältnis von Extraktgehalt, antioxidativer Aktivität und Gesamtphenolgehalt für weitergehende Untersuchungen am günstigsten. Die am wenigsten wirksamen Extrakte sind bei den Obst- und Beeren-sorten zu suchen. Zwar liefern diese Tees viel Extrakt (z. B. Apfel, wild ca. 63 %), haben aber nur sehr geringe Phenolgehalte (Apfel, wild: 2,3 %) und eine geringe antioxidative Aktivität (Apfel, wild: 0,1 mmol Trolox[®]/g Extrakt). Wie schon eingangs erwähnt, ist dies auf die hohen Zucker-gehalte dieser Proben zurückzuführen. Zucker liefert einen hohen Extrakt, leistet aber keinen Beitrag zur antioxidativen Wirksamkeit.

Mit den Untersuchungen zum Extraktgehalt, der antioxidativen Aktivität und der Gesamtphenolgehalte konnten wichtige Daten zur Beurteilung und zum Vergleich von Kräuter- und Früchtetees mit anderen Lebensmitteln gewonnen werden. Anhang A.VII stellt die Ergebnisse den von Henn und Stehle (1998) veröffentlichten Daten gegenüber. Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Proben sind kursiv dargestellt, die Sortierung folgt absteigend nach der antioxidativen Aktivität (TEAC).

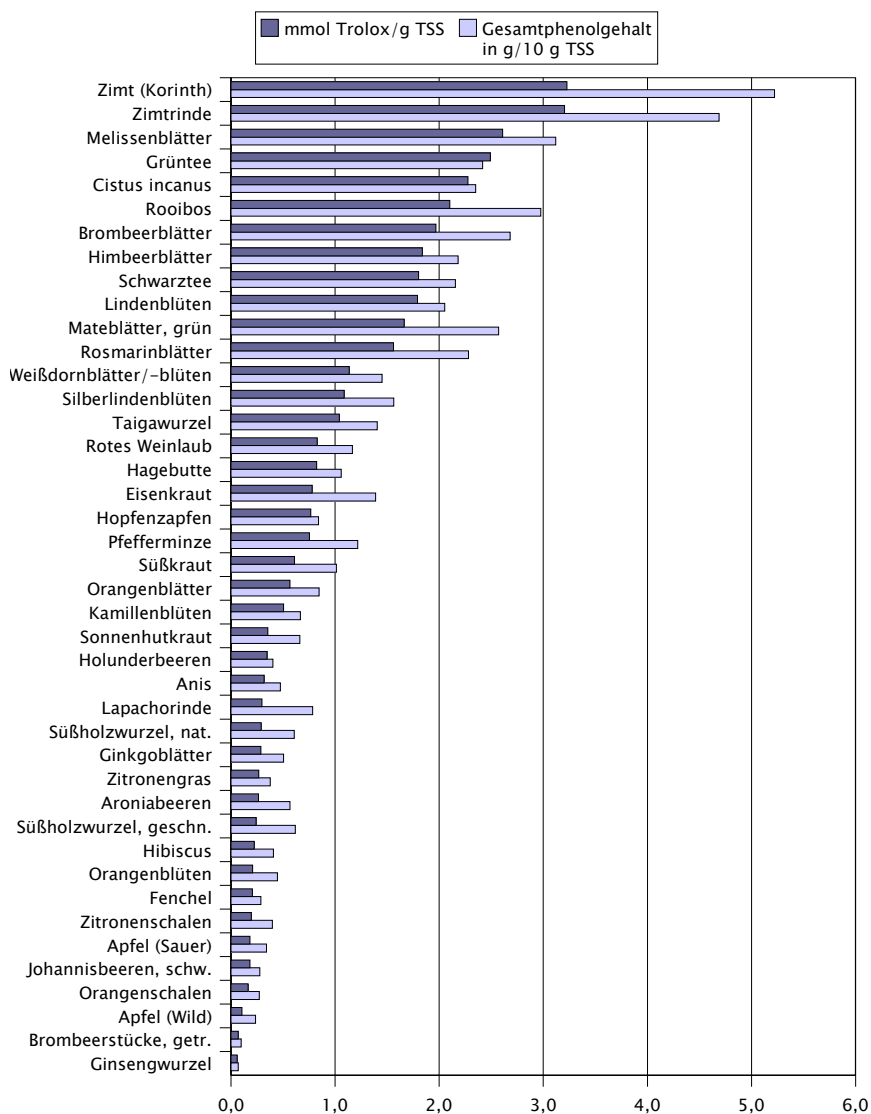


Abbildung 2.5: Antioxidative Aktivität und Gesamtphenolgehalte der wässrigen Extrakte bezogen auf extrahierbare Feststoffe (TSS)

Vergleicht man die Daten für grünen und schwarzen Tee so fällt auf, dass die in dieser Arbeit ermittelten Werte deutlich niedriger liegen, als in der Literatur beschrieben. Die Ursachen dafür sind vermutlich in der Sorte, der Herkunft und der Ernte der Tees und möglicherweise in der Art der Extraktion zu suchen. Darüber hinaus hat auch die geringere Einwaage an Probe (2 g statt 3 g/200 mL) einen Einfluss auf die Ergebnisse. Korrigiert man die Werte auf die veränderte Einwaage (Faktor 3/2), liegt der Grüntee mit 1071 mg/L Gesamtphenolgehalt im unteren Bereich der Untersuchungen von Henn und Stehle (1998) (970 – 1968 mg/L; Mittelwert: 1562 mg/L). Der Wert für den Schwarztee liegt korrigiert mit 1151 mg/L Gesamtphenolgehalt im mittleren Bereich der für Broken-Mischungen beschriebenen Gehalte (423 – 1400 mg/L; Mittelwert: 986 mg/L). Die gemessenen antioxidativen Aktivitäten liegen beim Grüntee korrigiert mit 11,03 mmol Trolox[®]/L und beim Schwarztee mit 6,54 mmol Trolox[®]/L ebenfalls im Bereich der in der Literatur beschriebenen Werte (Grüntee: 6,0 – 24,6 mmol Trolox[®]/L; Schwarztee: 4,6 – 18,3 mmol Trolox[®]/L).

Ein Vergleich der antioxidativen Aktivität der Kräuter- und Früchtetees mit den Literaturdaten zeigt, dass 19 der untersuchten Produkte in-vitro eine höhere Aktivität besitzen als Apfelsäfte (1,70 mmol Trolox[®]/L) und 7 noch einen höheren TEAC-Wert aufweisen, als die von Henn und Stehle gemessenen Multivitaminsäfte (3,5 mmol Trolox[®]/L). Einschränkend sei zwar erwähnt, dass für die Messungen hier eine andere Methodik verwendet wurde, ein Vergleich der Ergebnisse sollte aber dennoch möglich sein.

Besonders auffällig ist die große Abweichung der Literaturdaten für Johannisbeernektar und dem hier gemessenen Johannisbeer-„Tee“. Die Nektare haben laut Literatur hohe Gesamtphenolgehalte und eine hohe antioxidative Aktivität (über 9 mmol Trolox[®]/L). Ein Erklärungsansatz ist folgender: ein Nektar enthält mindestens 25 % Fruchtantteile. Bei

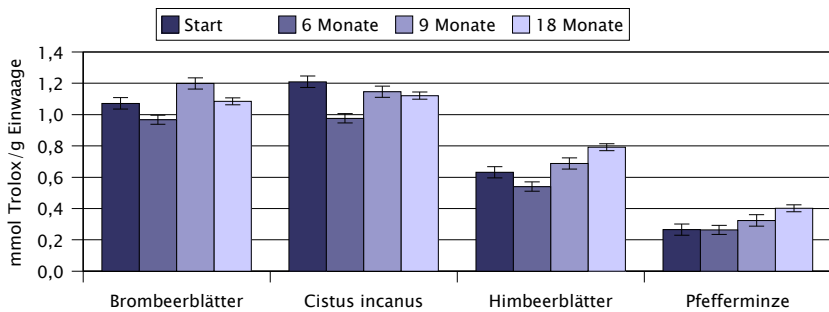
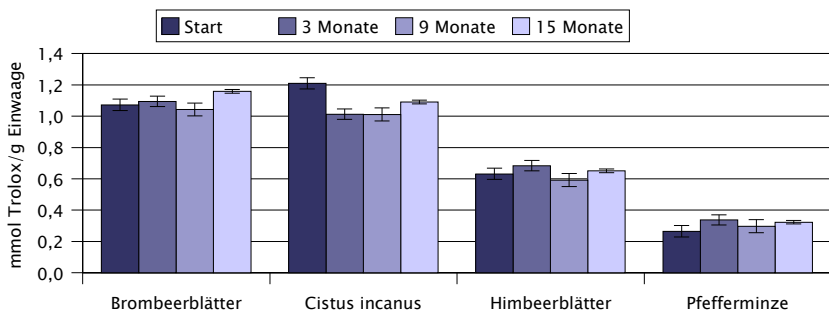
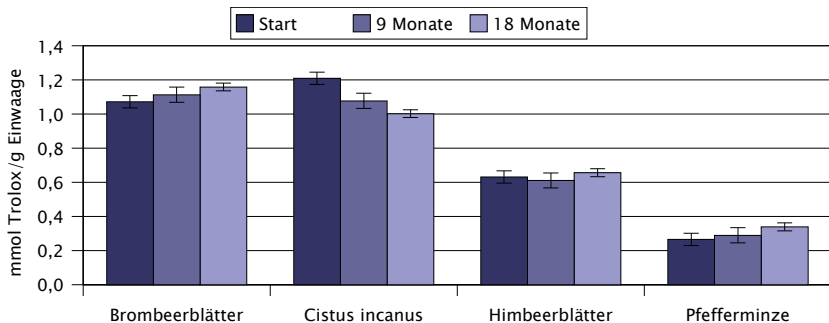
einem Wassergehalt der Johannisbeeren von etwa 81 % (Souci, Fachmann, Kraut, 1986) sind dies maximal 50 g Feststoffe aus der Frucht pro Liter. Die Teeaufgüsse wurden mit jeweils 2 g der getrockneten Produkte hergestellt, wodurch sich ein Faktor von 25 ergibt. Korrigiert man die Konzentrationsunterschiede mit diesem Faktor, liegen die gemessenen Werte in einer ähnlichen Größenordnung. Dies gilt sinngemäß auch für die anderen untersuchten Produkte.

Für die Beurteilung der Kräuter- und Früchtetees ist auch relevant, dass diese im Gegensatz zu Säften oder Wein keinen physiologischen Brennwert haben und somit keinen Beitrag zu einer Überernährung leisten. Auch entfallen die negativen Auswirkungen, die durch den Konsum von Alkohol entstehen. Insgesamt kann somit festgestellt werden, dass eine Reihe der untersuchten Kräuter- und Früchtetees einen positiven Beitrag zur antioxidativen Aktivität unserer Ernährung leisten können.

2.4 Versuche zur Lagerstabilität

Mit Hilfe der Daten aus dem Screening wurden Brombeerblätter, Cistus incanus, Himbeerblätter und Pfefferminze für weitergehende Untersuchungen ausgewählt. Zunächst wurde das Verhalten der Produkte hinsichtlich ihrer antioxidativen Aktivität bei der Lagerung unter verschiedenen Bedingungen bestimmt. Zur Messung wurden methanolische Extrakte eingesetzt, um eine möglichst vollständige Erfassung aller wirksamen Inhaltsstoffe zu erreichen. Wie im Screening wurde der modifizierte TEAC-Test nach Re et al. (1999) durchgeführt. Abbildungen 2.6 bis 2.9 zeigen die Ergebnisse der Messungen, die genauen Daten finden sich im Anhang in Abschnitt A.IV.1. Die Fehlerbalken stellen jeweils den Variationskoeffizient* einer Messreihe in Prozent dar.

* Doerffel (1984)

**Abbildung 2.6:** Lagerstabilität – Raumtemperatur (dunkel)**Abbildung 2.7:** Lagerstabilität – Raumtemperatur (diffuses Tageslicht)**Abbildung 2.8:** Lagerstabilität – Tiefkühlraum (-18 °C)

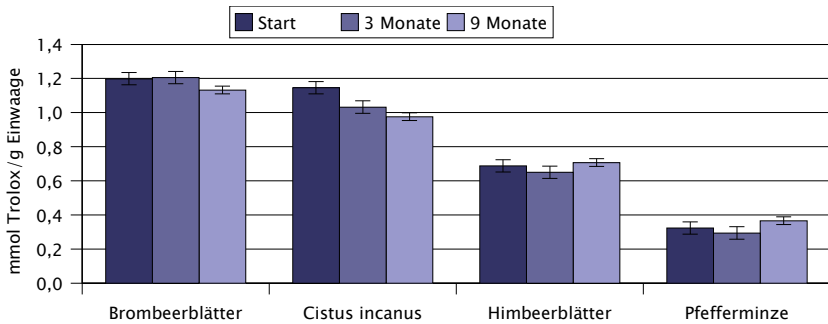


Abbildung 2.9: Lagerstabilität – Erhöhte Temperatur (+ 40 °C)

Die Diagramme zeigen ein recht uneinheitliches Bild. Außer *Cistus incanus* weist keines der untersuchten Produkte eine klare Tendenz zur Abnahme der antioxidativen Aktivität unter den vorgegebenen Bedingungen auf, und selbst hier hat sich die Größenordnung der antioxidativen Aktivität nicht geändert. Die Schwankungen können zum Teil darauf zurückzuführen sein, dass für die Messungen unterschiedliche Photometer verwendet wurden, zum Teil kann es an der Extraktion, der Aufarbeitung und möglicherweise auch an den Proben selber liegen, da es bei Naturprodukten erfahrungsgemäß auch innerhalb einer bestimmten Charge Schwankungen geben kann. Ob der bei einigen Proben gemessene Anstieg der Aktivität durch chemische Veränderungen der Inhaltsstoffe während der Lagerung ausgelöst wurde, ist nicht weiter untersucht worden. Ein Indiz dafür ist aus den Daten nicht ersichtlich.

2.5 Extraktionsversuche

Um die optimalen Bedingungen für den Übergang antioxidativ wirksamer Verbindungen in den Teeaufguss zu ermitteln, wurden exemplarisch am Beispiel der Pfefferminze Extraktionsversuche durchgeführt. Bestimmt wurden jeweils die Gehalte an extrahierbaren Feststoffen sowie die antioxidative Aktivität des Aufgusses bei verschiedenen Temperaturen und Ziehzeiten.

Die Aufgüsse wurden gemäß dem haushaltsüblichen Aufguss mit je 2 g Probe auf 200 mL Wasser in Doppelbestimmung hergestellt. Extrahiert wurde bei 40 °C, 60 °C, 80 °C und 95 °C für jeweils 1, 2, 3, 5, 10, 15 und 30 Minuten auf dem temperierten Wasserbad. Jeweils zu Beginn, nach der Hälfte (bei 30 Minuten alle 10 Minuten) und am Ende der Extraktionszeit wurde mit dem Glasstab umgerührt. In den Abbildungen 2.10 und 2.11 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt, die genauen Daten finden sich im Anhang in Abschnitt A.V.

Nach einer Extraktionszeit von 10 Minuten bei 95 °C ist bereits der größte Teil der löslichen Feststoffe in den Aufguss übergegangen (29,6 %). Da Extraktgehalt und antioxidative Aktivität miteinander korrelieren, erreicht diese ebenfalls zu diesem Zeitpunkt mit 0,34 mmol Trolox®/g Einwaage annähernd das Maximum. Eine Verlängerung der Extraktionszeit ist somit nicht sinnvoll, da kein weiterer signifikanter Anstieg von Extraktgehalt und antioxidativer Aktivität eintritt.

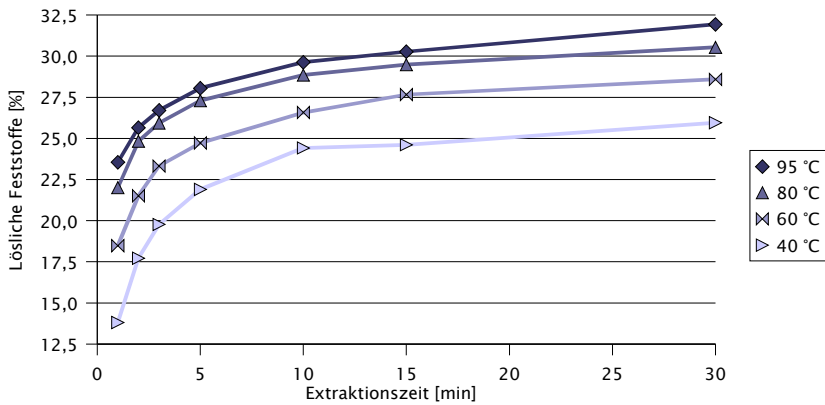


Abbildung 2.10: Gehalt an löslichen Feststoffen in Prozent

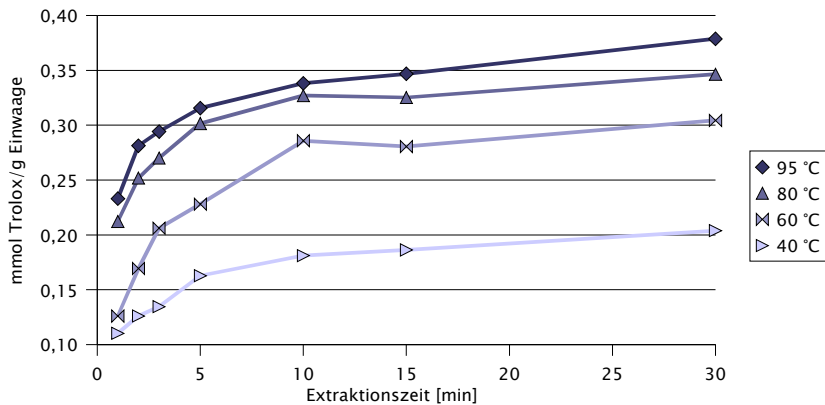


Abbildung 2.11: Antioxidative Aktivität in mmol Trolox[®]/g Einwaage

2.6 Brombeerblätter

2.6.1 Botanik der Brombeere

Abteilung:	Spermatophyta
Unterabteilung:	Magnoliophytina (Angiospermae)
Klasse:	Magnoliatae (Dicotyledoneae)
Unterklasse:	Rosidae
Ordnung:	Rosales
Familie:	Rosaceae
Gattung:	<i>Rubus</i> L.
Art:	<i>Rubus fruticosus</i> L. (engl.: shrubby blackberry)



Abbildung 2.12: Brombeerstaude nach E. Blackwell (1750 – 1773)

Rubus fruticosus L. bezeichnet eine Sammelart, die aus etwa 200 Kleinarten und Varietäten besteht. Wie auch Himbeere und Erdbeere gehört sie zu den über 2000 Arten umfassenden Rosengewächsen (Rosaceae). Der Wortstamm „Rubus“ leitet sich vom lateinischen „rubra = rot“ bzw. „rubellus = rötlich“ ab, „fruticosus“ bedeutet „voll Gebüsch“ und leitet sich vom lateinischen Wort „frutex“ für „Strauch, Gebüsch“ bzw. „fruticeti“ für „Gebüsch“ ab.

Das Verbreitungsgebiet erstreckt sich von Nordafrika über Europa bis nach Vorderasien. Die Brombeere bevorzugt sonnige bis halbschattige Lagen, z. B. lichte Wälder oder deren Ränder, mit kalk- und stickstoffreichen Böden.

Der Brombeerstrauch ist eine zwischen 50 und 300 cm hohe Kletterpflanze (Spreizklimmer) mit sehr stacheligen und verholzenden Stängeln. Die Stacheln dienen als Kletterhilfe und Fraßschutz. An den Trieben, die die Pflanze ausbildet, sitzen wechselständig unpaarig drei-, fünf- und siebenzählige gezähnte und gefiederte Blätter, die im Herbst nicht abgeworfen werden.

Erst im zweiten Jahr bildet die Pflanze von den einzelnen Trieben abgehend spezielle Seitentriebe, an deren Ende sich die Blütenstände befinden. Zwischen Juni und August bilden sich die meist weißen, selten rosafarbenen Blüten aus. Jede Blüte hat jeweils fünf Kelch- und Kronblätter und über 20 Staub- und Fruchtblätter. Der Boden der Blüte ist vorgewölbt. Nach der Blüte sterben die Triebe ab.

Die blauschwarzen Früchte sind, anders als der Name der Pflanze suggeriert, keine Beeren, sondern Sammelsteinfrüchte, die sich aus den einzelnen Fruchtblättern bilden. Anders als bei der Himbeere ist die Frucht fest an den Blütenboden gebunden. Von Juli bis Oktober können die Früchte geerntet werden.

Brombeeren sind selbstbefruchtend, d. h. der Blütenstaub einer anderen Pflanze ist für die Befruchtung nicht erforderlich. Eine vegetative Vermehrung geschieht über Ausläufer und Absenker.

2.6.2 Inhaltsstoffe und Verwendung

Die Blätter der Brombeere enthalten Gerbstoffe (Gallotannine, dimere Ellagitannine), organische Säuren (Äpfelsäure, Oxalsäure, Citronensäure), Flavonoide und pentacyclische Triterpensäuren. Getrocknet sind sie in der Naturheilkunde sehr beliebt. Sie wurden schon bei den alten Römern z. B. bei der Behandlung leichter Durchfallerkrankungen und bei leichten Entzündungen im Bereich der Mund- und Rachenschleimhaut eingesetzt. Auch als Wundheilmittel und zur Blutreinigung wurden sie verwendet.

In der Kosmetik kommen Brombeerblätter ebenfalls wegen ihres hohen Gerbstoffgehaltes zum Einsatz. Sie wirken hautklärend und porenverengend, weshalb man sie bei großporiger, unreiner Haut anwendet.

Aus den Blättern vor allem der Triebspitzen kann durch Fermentierung ein wohlschmeckender Tee gewonnen werden. Auch die unfermentierten Blätter werden zur Teebereitung verwendet.

2.6.3 Bisherige Untersuchungen an Brombeerblättern

Während die Früchte der Brombeere in zahlreichen Arbeiten auf phenolische Verbindungen und antioxidative Aktivität hin untersucht wurden (z. B. Dugo et al., 2001, Moyer et al., 2002, Jiao und Wang, 2000), stellt sich die Datenlage für die Blätter recht lückenhaft dar.

Henning (1981) untersuchte Flavonolglykoside der Blätter und Früchte vor allem von Erdbeeren und Himbeeren, in geringem Umfang aber

auch von Brombeeren. Als Hauptglykoside wurden 3- β -Glucuronide, 3- β -Glucoside und 3-Xylosylglucuronide, als Neben-Glykoside einige 3,7-Glykoside identifiziert. Bei Brombeerfrüchten wurde eine Dominanz von Kämpferol-3-glucosid/Quercetin-3-glucuronid festgestellt und das Vorhandensein von Rutin (Quercetin-3-rutinosid) mit Gehalten von 12 – 25 ppm (je nach Sorte) nachgewiesen. Qualitative und quantitative Bestimmungen wurden mit zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und HPLC/UV-Vis durchgeführt.

Wang und Lin (2000) untersuchten ebenfalls Blätter und Früchte von Erdbeeren, Himbeeren und Brombeeren, jedoch ausschließlich hinsichtlich ihrer antioxidativen Aktivität und ihrer Gesamtphenolgehalte. Es wurden weder quantitative Daten bestimmt noch einzelne Verbindungen isoliert.

2.6.4 Quantitative Bestimmungen

Bestimmt wurden die Gehalte an Flavan-3-olen, Hydroxyzimtsäurederivaten, neutralen und aciden Flavonol-O-glykosiden sowie Flavon-C-glykosiden. Die Aufarbeitung und Messung der einzelnen Stoffgruppen erfolgte gemäß Abschnitt 4.1.5 als Doppelbestimmung. Die Chromatogramme, UV- und massenspektrometrischen Daten der identifizierten Verbindungen befinden sich in Abschnitt 4.2.1.

In Tabelle 2.2 sind die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen als Summenparameter dargestellt. Die Angaben beziehen sich, wie auch in den folgenden Tabellen, jeweils auf die Trockenmasse (TM) von 92,6 %.

Tabelle 2.2: Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen von Polyphenolen in Brombeerblättern

	wässriger Extrakt [mg/kg TM]	methanol. Extrakt [mg/kg TM]
Flavan-3-ole	n. n.	n. n.
Hydroxyzimtsäurederivate	2738	3166
Flavonol-O-glykoside	171	195
acide Flavonol-O-glykoside	2381	2600
Flavon-C-glykoside	n. n.	n. n.

Hydroxyzimtsäurederivate

Tabelle 2.3: Hydroxyzimtsäurederivate in Brombeerblättern

	wässriger Extrakt [mg/kg TM]	methanol. Extrakt [mg/kg TM]
3-CQA	1023	1173
5-CQA	1714	1993

Eine Unterscheidung zwischen den 3-, 4- und 5-Derivaten der Caffeoyl-chinasäuren ist nur in begrenztem Umfang anhand der UV-Spektren möglich, da sich diese stark ähneln. Möglich wird dies erst über einen Vergleich der Retentionszeiten und der Massenspektren mit den von Clifford et al. (2003) ermittelten Daten.

Flavonol-O-glykoside

Tabelle 2.4: Flavonol-O-glykoside in Brombeerblättern

	wässriger Extrakt [mg/kg TM]	methanol. Extrakt [mg/kg TM]
Quercetin-glucosid oder -galactosid	84	98
Kämpferol-rutinosid	88	97

Eine Unterscheidung von Glucose und Galactose als Zuckerrest beim Quercetin ist aufgrund der identischen Masse von 180 g/mol im Massenspektrum nicht möglich.

Die im Chromatogramm auftretenden Peaks im Bereich von ca. 10 bis 30 Minuten deuten in ihren UV- und Massenspektren auf Chlorogensäure-Derivate hin. Da freie Chlorogensäuren jedoch nicht durch Methanol von der Polyamid-Säule eluiert werden, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei z. B. um Glykoside oder andere neutrale Ester handelt.

Acide Flavonol-O-glykoside

Tabelle 2.5: Acide Flavonol-O-glykoside in Brombeerblättern

	wässriger Extrakt [mg/kg TM]	methanol. Extrakt [mg/kg TM]
Quercetin-glucuronid oder -galacturonid	931	945
Kämpferol-glucuronid oder -galacturonid	1450	1655

Eine Unterscheidung von Glucuronsäure und Galacturonsäure ist aufgrund der identischen Masse von 194 g/mol im Massenspektrum nicht möglich.

Die im Chromatogramm auftretenden Signale im Bereich von ca. 10 bis 40 Minuten konnten anhand ihrer UV- und Massenspektren nicht näher identifiziert werden. Eine quantitative Auswertung ist somit auch nicht möglich.

2.7 Cistus incanus

2.7.1 Botanik von Cistus incanus

Abteilung:	Spermatophyta
Unterabteilung:	Magnoliophytina (Angiospermae)
Klasse:	Magnoliatae (Dicotyledoneae)
Unterklasse:	Dilleniidae
Ordnung:	Violales
Familie:	Cistaceae
Gattung:	<i>Cistus</i> L.
Art:	<i>Cistus incanus</i> L., (<i>C. creticus</i> L., <i>C. parviflorus</i> L., <i>C. villosus</i> L.) (engl.: hairy rockrose)



Abbildung 2.13: *Cistus creticus* nach N. J. Jacquin (1781 – 1793)

Cistus incanus L. gehört zur Familie der Zistrosengewächse. Das Verbreitungsgebiet dieses immergrünen bis zu 1 m hohen Strauches erstreckt sich über den gesamten Mittelmeerraum. Er wächst an sonnigen, trockenen Berghängen und lichten Waldrändern bevorzugt auf alkalischen, sandigen Böden mit hohem Magnesiumgehalt.

Die Blütezeit dauert von März bis Juni. Die zahlreichen, jeweils nur einen Tag blühenden, magentafarbenen Blüten haben einen Durchmesser von 4 bis 6 cm, das Herz der Blüte ist orange-gelb gefärbt. Ebenso wie die eiförmig-lanzettlich geformten Blätter sind die Blüten, wie für alle Zistrosen-Arten typisch, stark zerknittert. Der Name „*incanus*“ stammt vom lateinischen Wort „*canus*“ = „grau“ und ist auf die grau-grüne Färbung der Blätter zurückzuführen.

2.7.2 Inhaltsstoffe und Verwendung

Die Verwendung von *Cistus* lässt sich bis ins 4. Jahrhundert vor Christus zurückverfolgen. Kurz gekochte wässrige Extrakte werden zur lokalen Therapie entzündlicher Hauterkrankungen, zur Wundheilung und für Körperwaschungen eingesetzt.

2.7.3 Bisherige Untersuchungen an *Cistus incanus*

Zur Pharmakologie der Gattung *Cistus* L. liegen nur wenige Untersuchungen vor, die zudem hauptsächlich die etherischen Öle betreffen. Angelopoulou et al. (2001) und Demetzos et al. (2002) untersuchten beispielsweise die Unterschiede in der Zusammensetzung der etherischen Öle verschiedener *Cistus*-Arten per GC-MS. Sie fanden jeweils über 100 verschiedene flüchtige Verbindungen. Hierzu gehören Monoterpene, Sesquiterpene, Diterpene, Aldehyde, Ketone, Ester und einige andere Substanzklassen.

Petereit et al. (1991) und Danne et al. (1993) bestimmten Flavan-3-ole und Proanthocyanidine. Neben Catechin, Gallocatechin, Protocatechusäure, Shikimisäure und Gallocatechin-3-gallat identifizierten sie einige dimere und trimere Proanthocyanidine. Demetzos et al. (1989) untersuchten Flavonolglykoside. Sie fanden Kämpferol-3-O-glucosid, Quercetin-3-O-glucosid, Quercetin-3-O-rutinosid, Myricetin-3-O-rhamnosid und Myricetin-3-O-galactosid, bestimmten diese jedoch nur qualitativ.

2.7.4 Quantitative Bestimmungen

Bestimmt wurden die Gehalte an Flavan-3-olen, Hydroxyzimtsäurederivaten, neutralen Flavonol-O-glykosiden sowie Flavon-C-glykosiden. Die Aufarbeitung und Messung der einzelnen Stoffgruppen erfolgte gemäß Abschnitt 4.1.5 als Doppelbestimmung. Die Chromatogramme, UV- und massenspektrometrischen Daten der identifizierten Verbindungen befinden sich in Abschnitt 4.2.2.

In Tabelle 2.6 sind die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen als Summenparameter dargestellt. Die Angaben beziehen sich, wie auch in den folgenden Tabellen, jeweils auf die Trockenmasse (TM) von 92,9 %.

Tabelle 2.6: Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen von Polyphenolen in Cistus incanus

	wässriger Extrakt [mg/kg TM]	methanol. Extrakt [mg/kg TM]
Flavan-3-ole	1653	2457
Hydroxyzimtsäurederivate	n. n.	n. n.
Flavonol-O-glykoside	5505	10941
Flavon-C-glykoside	n. n.	n. n.

Flavan-3-ole

Tabelle 2.7: Flavan-3-ole in Cistus incanus

	wässriger Extrakt [mg/kg TM]	methanol. Extrakt [mg/kg TM]
Catechin	1653	2457

Da Catechin und Epicatechin sowohl ähnliche UV-Spektren, als auch die gleiche Masse von 290 g/mol haben, ist eine Unterscheidung allein anhand dieser Daten nicht möglich. Aufgrund der Retentionszeit von 10,2 Minuten und durch Vergleich mit Referenzsubstanzen ($RT_{\text{Epicatechin}} = 18$ Minuten) handelt es sich hier jedoch zweifelsfrei um Catechin.

Die weiteren Signale im Bereich von ca. 2 bis 20 Minuten konnten anhand ihrer UV- und Massenspektren nicht näher identifiziert werden. Da für die Bestimmung der Catechine keine besondere Aufarbeitung der Extrakte durchgeführt wurde, finden sich im Chromatogramm ab ca. 20 Minuten auch die unten beschriebenen Flavonol-O-glykoside wieder.

Flavonol-O-glykoside

Tabelle 2.8: Flavonol-O-glykoside in *Cistus incanus*

	wässriger Extrakt [mg/kg TM]	methanol. Extrakt [mg/kg TM]
Myricetin-galactosid (oder -glucosid)	1526	3089
Myricetin-rhamnosid	2873	5554
Quercetin-glucosid (oder -galactosid)	324	690
Quercetin-pentosid	234	522
Quercetin-rhamnosid	548	1077

Die Unterscheidung zwischen Glucose und Galactose ist auch hier aufgrund der identischen Masse von 180 g/mol im Massenspektrum nicht möglich. Da Demetzos et al. (1989) jedoch bereits Myricetin-galactosid und Quercetin-glucosid in *Cistus creticus* L. nachgewiesen haben, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hier ebenfalls um die entsprechenden Verbindungen handelt.

2.8 Himbeerblätter

2.8.1 Botanik der Himbeere

Abteilung:	Spermatophyta
Unterabteilung:	Magnoliophytina (Angiospermae)
Klasse:	Magnoliatae (Dicotyledoneae)
Unterklasse:	Rosidae
Ordnung:	Rosales
Familie:	Rosaceae
Gattung:	<i>Rubus</i> L.
Art:	<i>Rubus idaeus</i> L. (engl.: red raspberry)



Abbildung 2.14: Himbeerstaude nach O. W. Thomé (1885 – 1905)

Der Himbeerstrauch wird bis zu 150 cm groß, die Stängel sind mit feinen Stacheln besetzt. An den Trieben, die die Pflanze ausbildet, sitzen wechselständig drei-, fünf- und siebenzählige gezähnte und gefiederte Blätter.

Zwischen Mai und Juni bildet die Pflanze von den einzelnen Trieben abgehend doldenförmige Blütenstände mit weißen bis rosafarbenen Blüten aus. Jede Blüte hat jeweils fünf Kelch- und Kronblätter und über 20 Staub- und Fruchtblätter. Der Boden der Blüte ist dabei stark vorgewölbt.

Wie bei der zur selben Pflanzenfamilie gehörenden Brombeere sind die dunkelroten, weichen Früchte, anders als der Name suggeriert, keine Beeren, sondern Sammelsteinfrüchte, die sich aus den einzelnen Fruchtblättern bilden. Anders als bei der Brombeere ist die Frucht jedoch nur lose an den Blütenboden gebunden und kann leicht abgezogen werden. Sie ist saftig und sehr aromatisch und kann von Juli bis August geerntet werden. Die vegetative Vermehrung geschieht über Ausläufer und Absenker.

Das Verbreitungsgebiet der Himbeere erstreckt sich über die gesamte nördliche Hemisphäre. Sie bevorzugt halbschattige Lagen, z. B. Waldlichtungen oder Waldränder mit nährstoffreichen Böden. Man beobachtet jedoch, dass die Früchte um so aromatischer schmecken, je kärglicher das Nährstoffangebot ist.

Der Artnamen *idaeus* stammt aus dem Griechischen und bezieht sich auf den Strauch „batos idaios“, der auf dem Berg Ida wuchs.

2.8.2 Inhaltsstoffe und Verwendung

Schon der römische Schriftsteller Plinius (23 n. Chr.) erwähnt eine Pflanze „*Rubus idaeus*“ in seinen Schriften, von der die alten Kräuterärzte des Mittelalters annahmen, es sei die Himbeere. Da sie aufgrund der Familienzugehörigkeit ähnliche Inhaltsstoffe besitzt wie die Brombeere, wurde sie auch in ähnlicher Weise verwendet. Aus diesem Grund sei hier im Wesentlichen auf die Ausführungen in Abschnitt 2.6.2 verwiesen.

Heute haben Himbeerblätter kaum noch medizinische Bedeutung, man findet sie jedoch häufig in Teemischungen zur Blutreinigung. Aufgrund ihrer krampflösenden Eigenschaften werden Himbeerblättertees auch in der Frauenheilkunde bei Regelbeschwerden eingesetzt. Wissenschaftlich noch nicht bewiesen ist dagegen die Wirkungsweise bei Schwangeren. Es wird jedoch vermutet, dass die Muskulatur des kleinen Beckens stark aufgelockert und die Geburt dadurch erleichtert wird. Von einer Anwendung von Himbeerblättern in der frühen und mittleren Schwangerschaft wird deshalb abgeraten.

2.8.3 Bisherige Untersuchungen an Himbeerblättern

Ähnlich wie bei der Brombeere, standen auch bei der Himbeere die Früchte im Mittelpunkt wissenschaftlicher Untersuchungen (z. B. Kähkönen et al., 2001).

Wang und Lin (2000) untersuchten neben den Früchten auch die Blätter verschiedener Himbeerarten, bestimmten jedoch lediglich deren antioxidative Aktivität und die Gesamtphenolgehalte. Quantitative Daten wurden nicht ermittelt und auch keine Verbindungen isoliert.

Henning (1981) untersuchte, wie bereits bei den Brombeerblättern erwähnt, Flavonolglykoside der Blätter und Früchte von Erdbeeren, Himbeeren und Brombeeren. Als Hauptverbindungen identifizierte er bei Himbeerblättern Kämpferol- und Quercetin-3-glucuronid, daneben Kämpferol- und Quercetin-3-glucosid, Kämpferol- und Quercetin-3-galactosid, Kämpferol- und Quercetin-3-xylosyl-glucuronid sowie Kämpferol-3-xylosyl-glucosid, je nach Sorte mit Gehalten von ca. 50 bis 1200 ppm bezogen auf das Frischgewicht. Qualitative und quantitative Bestimmungen wurden mit zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie und HPLC/UV-Vis durchgeführt.

2.8.4 Quantitative Bestimmungen

Ermittelt wurden die Gehalte an Flavan-3-olen, Hydroxyzimtsäurederivaten, neutralen und aciden Flavonol-O-glykosiden sowie Flavon-C-glykosiden. Die Aufarbeitung und Messung der einzelnen Stoffgruppen erfolgte gemäß Abschnitt 4.1.5 als Doppelbestimmung. Die Chromatogramme, UV- und massenspektrometrischen Daten der identifizierten Verbindungen befinden sich in Abschnitt 4.2.3.

In Tabelle 2.9 sind die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen als Summenparameter dargestellt. Die Angaben beziehen sich, wie auch in den folgenden Tabellen, jeweils auf die Trockenmasse (TM) von 93,1 %.

Tabelle 2.9: Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen von Polyphenolen in Himbeerblättern

	wässriger Extrakt [mg/kg TM]	methanol. Extrakt [mg/kg TM]
Flavan-3-ole	n. n.	n. n.
Hydroxyzimtsäurederivate	1223	1255
Flavonol-O-glykoside	584	1268
acide Flavonol-O-glykoside	4991	7471
Flavon-C-glykoside	n. n.	n. n.

Hydroxyzimtsäurederivate

Tabelle 2.10: Hydroxyzimtsäurederivate in Himbeerblättern

	wässriger Extrakt [mg/kg TM]	methanol. Extrakt [mg/kg TM]
3-CQA	523	551
5-CQA	700	704

Wie bereits bei den Brombeerblättern erwähnt, ist eine Unterscheidung zwischen den 3-, 4- und 5-Derivaten der Caffeoylchinasäuren anhand ihrer UV-Spektren nicht möglich. Durch Vergleich der Retentionszeiten und der Massenspektren mit den von Clifford et al. (2003) ermittelten Daten lassen sie sich jedoch zuordnen. Aufgrund der guten Wasserlöslichkeit dieser Verbindungen gehen sie bei Himbeerblättern bereits in den wässrigen Extrakt nahezu vollständig über.

Auffällig sind die Konzentrationsunterschiede der Depside im Vergleich zu Brombeerblättern. Dort liegen die Gehalte etwa doppelt so hoch. Die im Screening festgestellte höhere antioxidative Aktivität der Brombeerblätter ist möglicherweise auf dieses Verhältnis zurückzuführen.

Flavonol-O-glykoside

Tabelle 2.11: Flavonol-O-glykoside in Himbeerblättern

	wässriger Extrakt [mg/kg TM]	methanol. Extrakt [mg/kg TM]
Quercetin-glucosid-pentosid oder -galactosid-pentosid	184	350
Quercetin-galactosid oder -glucosid	97	238
Quercetin-glucosid oder -galactosid	186	333
Quercetin-pentosid	64	229
Kämpferol-glucosid oder -galactosid	53	117

Anhand der Massenspektren handelt es sich bei der ersten Verbindung um ein Quercetin-diglykosid aus einer Pentose und Glucose bzw. Galactose. Henning (1981) identifizierte als Pentosyl-glucosid das Kämpferol-3-xylosyl-glucosid, jedoch nicht das Quercetin-Derivat. Darüber hinaus finden sich zwei Quercetin-glykoside mit identischen Fragmenten im Massenspektrum, demzufolge sowohl das Glucosid, als auch das Galactosid vorliegen. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Untersuchungen von Henning (1981), der ebenfalls beide Quercetin-glykoside identifiziert hat. Üblicherweise eluieren bei der HPLC unter den gege-

benen Bedingungen die Galactoside vor den Glucosiden, weshalb auch hier die Reihenfolge Quercetin-galactosid – Quercetin-glucosid zu vermuten ist. Eine exakte Identifizierung der Zuckerreste konnte jedoch allein über UV- und Massenspektren nicht vorgenommen werden.

Wie schon bei den Brombeerblättern finden sich auch hier im Chromatogramm Signale im Bereich von ca. 10 bis 30 Minuten, die in ihren UV- und Massenspektren auf Chlorogensäure-Derivate hindeuten. Da die freien Chlorogensäuren durch Methanol jedoch nicht von der Polyamid-Säule eluiert werden, liegt hier ebenfalls die Vermutung nahe, dass es sich z. B. um Glykoside oder andere neutrale Ester der Chlorogensäuren handelt.

Acide Flavonol-O-glykoside

Tabelle 2.12: Acide Flavonol-O-glykoside in Himbeerblättern

	wässriger Extrakt [mg/kg TM]	methanol. Extrakt [mg/kg TM]
Quercetin-glucuronid oder -galacturonid	3872	5768
Kämpferol-glucuronid oder -galacturonid	1119	1703

Eine Unterscheidung von Glucuronsäure und Galacturonsäure ist aufgrund der identischen Masse von 194 g/mol im Massenspektrum nicht möglich.

Während die Konzentration des Kämpferol-Derivats bei den Brombeerblättern in einer ähnlichen Größenordnung liegt, sind beim Quercetin-Derivat jedoch sehr deutliche Unterschiede festzustellen (Brombeerblät-

ter ca. 1 g/kg in beiden Extrakten). Möglicherweise könnte diese Verbindung als Unterscheidungsmerkmal beider *Rubus*-Arten dienen, um etwa Verfälschungen in Kräuter-Mischungen nachweisen zu können.

Die von Henning (1981) ebenfalls identifizierten Xylosyl-glucoside des Kämpferols und des Quercetins konnten nicht nachgewiesen werden.

Die im Chromatogramm auftretenden Signale im Bereich von ca. 10 bis 40 Minuten konnten anhand ihrer UV- und Massenspektren nicht näher identifiziert werden. Eine quantitative Auswertung ist somit auch nicht möglich.

2.9 Pfefferminze

2.9.1 Botanik der Pfefferminze

Abteilung:	Spermatophyta
Unterabteilung:	Magnoliophytina (Angiospermae)
Klasse:	Magnoliatae (Dicotyledoneae)
Unterklasse:	Asteridae
Ordnung:	Lamiales
Familie:	Lamiaceae
Gattung:	<i>Mentha</i> L.
Art:	<i>Mentha × piperita</i> L. (pro sp.) [aquatica × spicata] (engl.: peppermint)

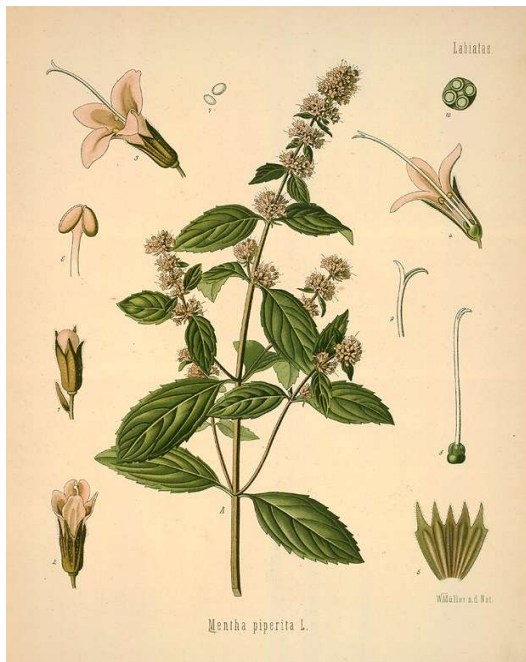


Abbildung 2.15: *Mentha piperita* L. nach F. E. Köhler (1883 – 1914)

Die 50 bis 90 cm hohe echte Pfefferminze gehört zur Familie der Lippenblütler, die insgesamt über 3500 Arten umfasst. Sie ist eine Kreuzung aus der Wassermintze (*Mentha aquatica*) und der Grünen Minze (Ährenminze, *Mentha spicata*), die ihrerseits aus den Arten *Mentha longifolia* und *Mentha rotundifolia* hervorging. Der Biologe John Ray (1628 – 1705) entdeckte diesen natürlichen Dreifach-Bastard 1696 in einem englischen Garten in einer Kultur der Grünen Minze, weshalb sie in den alten und berühmten Kräuterbüchern z. B. von Leonhart Fuchs (1501 – 1566), Adam Lonitzer (1528 – 1586) oder dem Hortus Eystettensis von 1613 nicht zu finden ist. Wegen ihres scharfen Geschmacks nannte Ray diese Pflanze „Peppermint“.

Der holzig verdickte Wurzelstock treibt vierkantige, höchstens im oberen Teil verzweigte, aufrechte oder aufsteigende Stängel. Aus genetischen Gründen kann die Pfefferminze nicht aus Samen gezogen werden. Sie vermehrt sich daher vor allem durch ober- und unterirdisch kriechende Ausläufer. Die oft rötlich überlaufenen Sprosse sind meist kahl und glänzend oder zerstreut behaart. Die ca. 5 cm großen, tiefgrünen, kreuz-gegenständigen Laubblätter sind schmal eiförmig bis lanzettlich, spitz und gestielt. Sie haben einen scharf gesägten Rand und 5 bis 8 Paar Seitennerven. Beim Zerreiben der Blätter entfaltet sich der typische Menthol-Geruch.

Die gestielten, lilafarbenen Blüten stehen zahlreich in den Achseln von Tragblättern und bilden dichte oder am Grund unterbrochene, meist rispig gehäufte, 3 bis 7 cm lange Scheinähren. Der glockige Kelch ist 2 mm lang, gleichmäßig fünfzählig und schwach zweilippig. Die vierlappige, kaum lippige Krone ist deutlich länger als der Kelch. Blütezeit ist von Juni bis Juli. Die Früchte bestehen aus je vier eiförmigen einsamigen Nüsschen.

Pfefferminze gedeiht auf leichten, humusreichen Böden, an sonnigen, aber nicht zu trockenen Standorten. Angebaut wird sie in Europa, Nord- und Südamerika sowie in Asien. Sie kommt vereinzelt auch auf feuchten Wiesen und am Wasser verwildert vor.

2.9.2 Inhaltsstoffe und Verwendung

Ausgangsmaterial für Arzneimittel und Tees sind die Blätter der Pflanze. Medizinisch bedeutsam ist vor allem das etherische Öl (0,5 – 3,0 %), dessen Hauptbestandteile Menthol (35 – 45 %), Methylacetat, Menthon (15 – 20 %), Cineol und Menthofuran darstellen.

Spezielle Blattextrakte bilden die Basis für Dragees und Tabletten. Bei innerer Anwendung wirken die Extrakte krampflösend, blähungs- und galletreibend und vermutlich auch antibakteriell, antiviral und sedativ. Besondere Bedeutung haben Arzneimittel aus Pfefferminzblättern bei der Behandlung des Reizdarms.

Äußerlich finden Zubereitungen die Pfefferminzöl enthalten bei Inhalationen und Einreibungen, z. B. zur Behandlung von Atemwegserkrankungen, als Badezusatz oder in Zahnpasta Verwendung. Darüber hinaus werden Pfefferminzblätter auch in der Küche und für die Herstellung von Pralinen und Kaugummis verwendet.

Neben dem etherischen Öl sind in der Droge Phenolcarbonsäuren, Triterpene und Flavonoide enthalten.

2.9.3 Bisherige Untersuchungen an Pfefferminze

Da das etherische Öl der Pfefferminze medizinisch die größte Bedeutung besitzt, nehmen Untersuchungen darüber auch den größten Raum in der Literatur ein. Während sich ältere Arbeiten vornehmlich mit dessen Zu-

sammensetzung auseinander setzen (z. B. Bankowski, 1953), stehen heute eher die Biosynthese und die Wirkung der Inhaltsstoffe im Vordergrund der Untersuchungen (z. B. Mahmoud und Croteau, 2003, Mimica-Dukic et al., 2003).

Duband et al. (1992) bestimmten die Zusammensetzung der Pfefferminzblätter. Neben 2,4 % etherischem Öl, mit dem Hauptbestandteil Menthol (0,99 %), ermittelten sie einen Gesamtphenolgehalt von 19 %, wobei 12 % auf Flavonoidglykoside entfallen, 7 % auf Hydroxyzimtsäurederivate. Von diesen stellt die Rosmarinsäure mit 1,4 % den größten Anteil. 7 % der Flavonoidglykoside entfallen auf die Hauptverbindung Eriodictyol-7-O-rutinosid. Luteolin-7-O-rutinosid weist einen Anteil von 1,5 % auf.

Phenolische Inhaltsstoffe wurden ebenfalls von Guédon und Pasquier (1994) sowie Areias et al. (2001) per HPLC/UV-Vis qualitativ und quantitativ untersucht. Sie identifizierten Eriodictyol-7-O-rutinosid und -glucosid, Luteolin-7-O-rutinosid und -glucosid, Hesperetin-7-O-rutinosid, Apigenin-7-O-rutinosid, Diosmetin-7-O-rutinosid, Naringenin-7-O-rutinosid, Rosmarinsäure und einige andere phenolische Verbindungen. Die Gehalte der einzelnen Substanzen schwanken teilweise deutlich je nach untersuchter Probe (Daten von Areias et al., 2001: Eriodictyol-7-O-rutinosid: 1000 – 5000 mg/kg; Eriodictyol-7-O-glucosid: 55 – 550 mg/kg; Luteolin-7-O-rutinosid: 370 – 1200 mg/kg; Luteolin-7-O-glucosid: 40 – 200 mg/kg; Hesperetin-7-O-rutinosid: 600 – 2100 mg/kg; Apigenin-7-O-rutinosid: 25 – 240 mg/kg; Rosmarinsäure: 760 – 4400 mg/kg, jeweils bezogen auf die Trockenmasse).

2.9.4 Quantitative Bestimmungen

Bestimmt wurden die Gehalte an Flavan-3-olen, Hydroxyzimtsäurederivaten, Flavon- und Flavanon-O-glykosiden, aciden Flavon-O-glykosiden sowie Flavon-C-glykosiden. Die Aufarbeitung und Messung der einzel-

nen Stoffgruppen erfolgte gemäß Abschnitt 4.1.5 als Doppelbestimmung. Die Chromatogramme, UV- und massenspektrometrischen Daten der identifizierten Verbindungen befinden sich in Abschnitt 4.2.4.

In Tabelle 2.13 sind die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen als Summenparameter dargestellt. Die Angaben beziehen sich, wie auch in den folgenden Tabellen, jeweils auf die Trockenmasse (TM) von 91,3 %.

Tabelle 2.13: Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen von Polyphenolen in Pfefferminze

	wässriger Extrakt [mg/kg TM]	methanol. Extrakt [mg/kg TM]
Flavan-3-ole	n. n.	n. n.
Hydroxyzimtsäurederivate	7254	9122
Flavon-O-glykoside	8693	11327
Flavanon-O-glykoside	2462	2802
acide Flavon-O-glykoside	2009	3155
Flavon-C-glykoside	n. n.	n. n.

Hydroxyzimtsäurederivate

Tabelle 2.14: Hydroxyzimtsäurederivate in Pfefferminze

	wässriger Extrakt [mg/kg TM]	methanol. Extrakt [mg/kg TM]
5-CQA	95	100
4-CQA	191	194
Rosmarinsäure	6968	8828

Durch Vergleich der Retentionszeiten und der Massenspektren mit den von Clifford et al. (2003) ermittelten Daten können die Signale der 3-, 4- und 5-Derivate der Depside unterschieden werden.

Die weiteren Peaks im Chromatogramm konnten über ihre UV- und Massenspektren nicht zugeordnet werden.

Rosmarinsäure wurde aus den Chromatogrammen der Flavan-3-ole (Catechine) quantifiziert, da dort keine gesonderte Aufreinigung der Extrakte durchgeführt wurde. In Abschnitt 4.1.5.3 ist die genaue Durchführung beschrieben.

Flavon- und Flavanon-O-glykoside

Die Quantifizierung der Flavon- und Flavanon-O-glykoside erfolgte analog der FOG-Bestimmung nach Abschnitt 4.1.5.5.

Tabelle 2.15: Flavon-O-glykoside in Pfefferminze

	wässriger Extrakt [mg/kg TM]	methanol. Extrakt [mg/kg TM]
Luteolin-rutinosid	7895	10189
Apigenin-rutinosid	798	1138

Tabelle 2.16: Flavanon-O-glykoside in Pfefferminze

	wässriger Extrakt [mg/kg TM]	methanol. Extrakt [mg/kg TM]
Hesperetin-rutinosid	2462	2802

Die ebenfalls identifizierten Verbindungen Diosmetin-rutinosid und Eriodictyol-rutinosid konnten aufgrund fehlender Standards nicht exakt quantitativ bestimmt werden. Durch Vergleich der Peakflächen mit den Standards der Flavone (Diosmetin) und Flavanone (Eriodictyol) lassen sich die Gehalte dennoch grob abschätzen. Beim Diosmetin-rutinosid liegt der Gehalt im wässrigen Extrakt etwa zwischen 1,0 und 1,5 g/kg, im methanolischen Extrakt zwischen 1,5 und 2,0 g/kg und damit etwa doppelt so hoch wie beim Apigenin-rutinosid. Eriodictyol-rutinosid stellt die Hauptverbindung dar mit Gehalten von ca. 13 bis 14 g/kg im wässrigen Extrakt und 15 bis 16 g/kg im methanolischen Extrakt. Dies ist aus dem Chromatogramm nicht sofort ersichtlich, es zeigt jedoch die für Flavon- und Flavonol-O-glykoside optimale Wellenlänge von 354 nm. Das Absorptionsmaximum der Flavanone liegt dagegen bei ca. 284 nm. Bei 354 nm zeigen sie nur noch eine geringe Absorption.

Die Gesamtgehalte an Flavon- und Flavanon-O-glykosiden liegen somit bei ca. 26 g/kg im wässrigen und ca. 32 g/kg im methanolischen Extrakt (entspricht ca. 3 %).

Acide Flavon-O-glykoside

Tabelle 2.17: Acide Flavon-O-glykoside in Pfefferminze

	wässriger Extrakt [mg/kg TM]	methanol. Extrakt [mg/kg TM]
Luteolin-diglucuronid	337	1187
Luteolin-glucuronid	1672	1967

Eine Unterscheidung von Glucuronsäure und Galacturonsäure ist aufgrund der identischen Masse von 194 g/mol im Massenspektrum nicht möglich. Durch Isolierung der beiden Luteolin-Derivate, Aufnahme von

Kernresonanzspektren und deren Vergleich mit Literaturdaten handelt es sich hierbei jedoch sehr wahrscheinlich um die Glucuronide und nicht die Galacturonide (s. Abschnitt 2.9.5).

Die deutlich höheren Gehalte der untersuchten Inhaltsstoffe der Pfefferminze, im Vergleich zu den von Areias et al. (2001) ermittelten Werten, sind hauptsächlich auf die unterschiedliche Art der Extraktion zurückzuführen. Während Areias et al. reines Ethanol verwendeten und für 30 Minuten bei Raumtemperatur extrahierten, wurde hier mit 70%ig wässrigem Methanol bei 70 °C und für 20 Minuten extrahiert. Des weiteren wurde mit feiner gemahlenem Probenmaterial gearbeitet (0,5 mm statt 0,9 mm). Da in der Literatur bereits deutliche Abweichungen der Gehalte im Probenmaterial selber vorzufinden sind, ist auch hier eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Werte zu suchen.

Betrachtet man die Gesamtgehalte der in den vier Pflanzen untersuchten Stoffklassen, fällt eine Diskrepanz zu den ermittelten antioxidativen Aktivitäten und Gesamtphenolgehalten ins Auge. Findet sich dort in den wässrigen Extrakten eine Reihenfolge Brombeerblätter – *Cistus incanus* – Himbeerblätter – Pfefferminze, liegt nun die Pfefferminze mit ca. 35 g/kg quantifizierten antioxidativ wirksamen Verbindungen vorne, gefolgt von *Cistus incanus* mit ca. 7,1 g/kg, Himbeerblättern mit ca. 6,8 g/kg und schließlich Brombeerblättern mit ca. 5,3 g/kg. Mehrere Gründe kommen für diese Beobachtung infrage. In den Chromatogrammen von Brombeerblättern, Himbeerblättern und *Cistus incanus* finden sich zahlreiche Signale, die hier nicht identifiziert und somit auch nicht quantifiziert werden konnten, die aber dennoch von Substanzen stammen können, die ein antioxidatives Potenzial besitzen. Bei Pfefferminze konnten dagegen fast alle Inhaltsstoffe, die in den Chromatogrammen auftraten, zugeordnet und quantifiziert werden. Ebenfalls von Bedeutung sind auch die antioxidativen Eigenschaften der einzelnen Verbindungen und Verbindungsklassen. In der Literatur finden sich für Catechine TEAC-

Werte von 2–4 mmol Trolox[®]/g und für Chlorogensäuren von 1–2 mmol Trolox[®]/g. Re et al. (1999) bestimmten die TEAC-Werte von Naringenin (Flavanon) mit 1,1 mmol Trolox[®]/g, von Luteolin (Flavan) mit 2,1 mmol Trolox[®]/g, von Kämpferol (Flavonol) mit 1,0 mmol Trolox[®]/g und von Quercetin (Flavonol) mit 3,1 mmol Trolox[®]/g. Allein anhand dieser Unterschiede lässt sich sehen, dass ein hoher Gehalt einer bestimmten Verbindung nicht zwangsläufig in einer insgesamt hohen antioxidativen Aktivität resultieren muss. Außerdem konnten gerade bei der Pfefferminze vor allem glykosidisch gebundene Flavonoide identifiziert werden, deren Zuckerreste zwar ein hohes Molekulargewicht bedingen, aber die antioxidative Wirksamkeit der Aglyka dabei nicht erhöhen.

Denkbar ist ebenfalls, dass in den untersuchten Pflanzen weitere antioxidativ wirksame Verbindungsklassen wie Proanthocyanidine, Carotinoide, Terpene etc. enthalten sind, die im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht wurden, die aber ebenfalls ein nicht unerhebliches antioxidatives Potenzial aufweisen könnten.

2.9.5 Isolierung und Identifizierung einzelner Inhaltsstoffe

2.9.5.1 Extraktion und Reinigung

Zur Isolierung einzelner Inhaltsstoffe aus Pfefferminze wurde eine Extraktion in größerem Maßstab durchgeführt. Dazu wurden mehrmals ca. 50 g Feinschnitt, wie in den Abschnitten 4.1.4.6 und 4.1.4.7 beschrieben, mit 70%igem Methanol extrahiert, nach Filtration mit Hexan ausgeschüttelt, die methanolisch-wässrige Phase am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand gefriergetrocknet. Es wurden 12 Extraktionen mit insgesamt 582 g des Feinschnitts durchgeführt. Die Ausbeute an Rohextrakt betrug 101 g. Dies entspricht einem Anteil von

17,4 %. Der TEAC-Wert dieses Extrakts lag bei 0,97 mmol Trolox[®]/g (vgl. lösliche Feststoffe des wässrigen Aufgusses: 0,75 mmol Trolox[®]/g).

In mehreren Durchgängen wurde der Rohextrakt säulenchromatographisch über Amberlite[™] XAD[™]-16HP aufgereinigt. Nach Aufgabe von jeweils etwa 6 g, gelöst in 20 mL Wasser, wurde der Extrakt für gut 30 Minuten, zur Adsorption der antioxidativ wirksamen Verbindungen, auf der Säule belassen. Danach wurden alle nicht adsorbierten Stoffe, wie z. B. freie Zucker, Säuren oder Alkaloide, mit Wasser von der Säule gespült und anschließend die adsorbierten Verbindungen mit reinem Methanol eluiert. Die vereinigten methanolischen Eluate wurden wieder vom Lösungsmittel befreit und gefriergetrocknet. In 9 Läufen wurden 53,1 g Rohextrakt gereinigt. Die Ausbeute betrug 26,7 g bzw. 44,5 %. Der TEAC-Wert dieses gereinigten Extraktes lag mit 1,52 mmol Trolox[®]/g noch einmal deutlich über dem des ungereinigten Rohextraktes. Weitere 55,1 % oder 29,3 g des eingesetzten Rohextrakts fanden sich in der wässrigen Spülphase wieder. Da der theoretische TEAC-Wert des gereinigten Rohextraktes bei einer Ausbeute von 44,5 % gegenüber dem ungereinigten Rohextrakt etwa 2 mmol Trolox[®]/g betragen sollte, lag die Vermutung nahe, dass ein Teil der antioxidativ wirksamen Verbindungen in die Spülphase gelangt ist. Aus diesem Grund wurde der TEAC-Wert der gefriergetrockneten Spülphase bestimmt und ein Wert von 0,33 mmol Trolox[®]/g ermittelt. Um festzustellen, welche Inhaltsstoffe hierfür verantwortlich sind, wurde die Spülphase nach der in Abschnitt 4.1.5.5 beschriebenen Methode für Flavonol-O-glykoside per HPLC-MS/MS vermessen. Abbildung 2.16 zeigt das Chromatogramm als Totalionenstrom. Es zeigt acht Verbindungen, von denen fünf, soweit es allein über Massenspektren möglich ist, zugeordnet werden konnten: Caffeoylglucose bzw. Kaffeesäureglucosid, Chinasäure, Rhamnetin oder Isorhamnetin, Luteolin-diglucuronid und Eriodictyol-rutinosid. Bis auf die letzten beiden Substanzen, die auch in anderen Fraktionen der Pfefferminze nachgewiesen werden konnten, handelt es sich jedoch weitgehend um

Vermutungen, die nicht näher verifiziert wurden. Die restlichen drei, in der Spülphase enthaltenen Verbindungen, konnten nicht identifiziert werden. Da es hier nicht um eine quantitative Bestimmung der Inhaltsstoffe ging, wurde auf eine Rückgewinnung der antioxidativ wirksamen Verbindungen verzichtet.

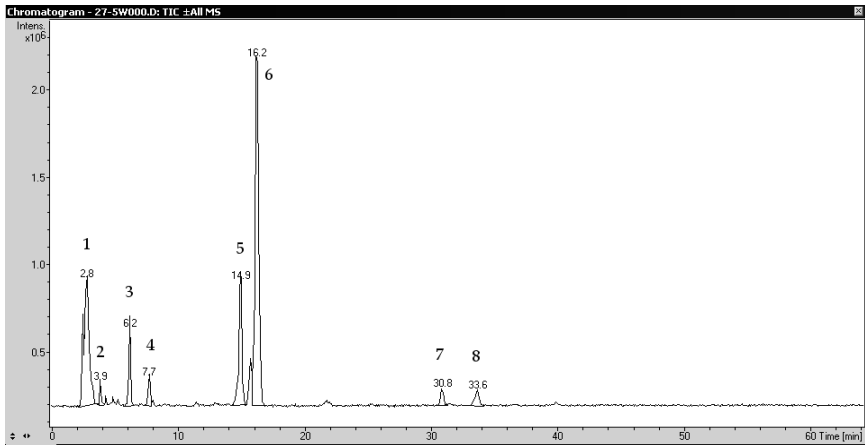


Abbildung 2.16: Pfefferminze – Spülphase der XAD™-16HP-Aufreinigung des Rohextraktes (Totalionenstrom, TIC)

- Peak 1 (RT = 2,8 min): ESI-MS (neg. Modus): m/z 341 = $[M - H^+]$, m/z 179 = $[M - \text{Hexose} + H_2O - H^+]$; **Caffeoylglucose/Kaffeesäureglucosid**
- Peak 2 (RT = 3,9 min): ESI-MS (neg. Modus): m/z 191 = $[M - H^+]$; MS^2 : m/z 111; **Chinasäure**
- Peak 3 (RT = 6,2 min): ESI-MS (neg. Modus): m/z 409 = $[M - H^+]$; MS^2 : m/z 241; unbekannte Verbindung
- Peak 4 (RT = 7,7 min): ESI-MS (neg. Modus): m/z 315 = $[M - H^+]$; MS^2 : m/z 153; **Rhamnetin/Isorhamnetin**

- Peak 5 (RT = 14,9 min): ESI-MS (neg. Modus): m/z 467 = $[M - H^+]$; MS^2 (rel. Int. %): m/z 387 (100), 241 (4); unbekannte Verbindung
- Peak 6 (RT = 16,2 min): ESI-MS (neg. Modus): m/z 305 = $[M - H^+]$; MS^2 : m/z 225; unbekannte Verbindung
- Peak 7 (RT = 30,8 min): ESI-MS (neg. Modus): m/z 637 = $[M - H^+]$, m/z 285 = $[M - 2 \text{ Hexosesäure} + 2 H_2O - H^+]$; **Luteolin-di-glucuronid**
- Peak 8 (RT = 33,6 min): ESI-MS (neg. Modus): m/z 595 = $[M - H^+]$, m/z 287 = $[M - \text{Desoxyhexose} - \text{Hexose} + 2 H_2O - H^+]$; **Eriodictyol-rutinosid**

Ein weiterer Verlust an antioxidativer Aktivität ist in den restlichen 4,4 % Massendifferenz zwischen eingesetztem Rohextrakt und den Ausbeuten an Spülphase und methanolischem Eluat zu suchen. Die Ursachen dafür sind vermutlich auf eine unvollständige Elution aller antioxidativ wirksamen Verbindungen vom Säulenmaterial, durch irreversible Adsorption oder auf Artefaktbildungen und damit den Verlust der antioxidativen Eigenschaften einzelner Substanzen, zurückzuführen.

2.9.5.2 Vorfraktionierung des Extraktes mittels HSCCC

Der über XADTM-16HP gereinigte Rohextrakt wurde zur weiteren Fraktionierung mit Hilfe der High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) aufgetrennt. Als Fließmittelsystem wurde das für die Trennung von mittelpolaren Substanzen bewährte System Chloroform/Methanol/Wasser (7 : 13 : 8 ; v/v/v) verwendet (Degenhardt, 2002). Die leichte Phase diente dabei als stationäre, die schwere Phase als mobile Phase. Daraus ergibt sich der Modus „Head to Tail“ als Richtung der Trennung. Pro Lauf wurden 0,8 g Extrakt, gelöst in je 15 mL mobiler und stationärer Phase, aufgegeben. Abbildung 2.17 zeigt das Chromatogramm bei 244 nm.

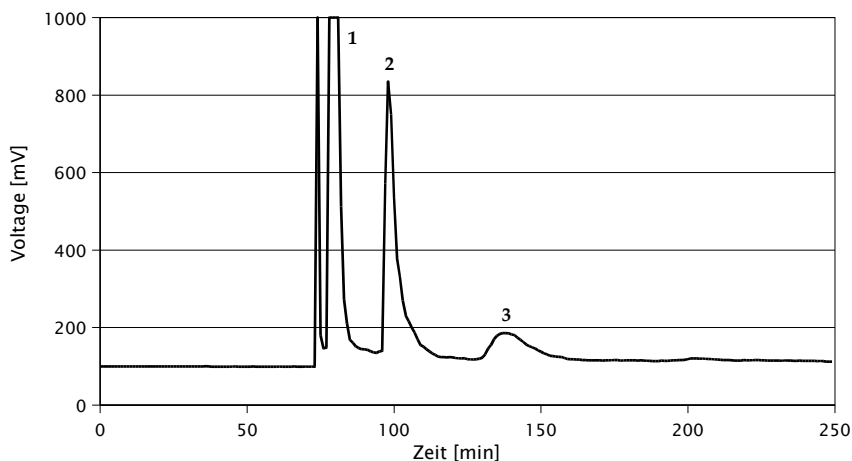


Abbildung 2.17: HSCCC-Chromatogramm der Pfefferminze (244 nm)

Drei Fraktionen wurden daraus gewonnen: Fraktion 1: 75 min – 90 min, Fraktion 2: 95 min – 120 min und Fraktion 3: 125 min – 170 min.

2.9.5.3 Semipräparative HPLC

Die drei Fraktionen der HSCCC wurden nun weiter mittels semipräparativer HPLC aufgetrennt (s. Abschnitt 4.1.4.9). Für Fraktion 1 wurde dabei Gradient A verwendet, für die Fraktionen 2 und 3 Gradient B.

Von den isolierten Verbindungen wurden dann ESI-MSⁿ- und UV-Spektren aufgenommen. Dadurch konnten bereits wichtige Hinweise auf die Struktur der einzelnen Substanzen gewonnen werden. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden bei ausreichender Substanzmenge ¹H- und ¹³C-Spektren aufgenommen. So konnten schließlich aus Fraktion 1 Luteolin-rutinosid (27H1.1) und das bisher in Pfefferminze nicht beschriebene Luteolin-diglucuronid (27H1.2) isoliert und identifiziert werden, aus Fraktion 2 Eriodictyol-rutinosid (27H2.1), das ebenfalls noch nicht beschriebene Luteolin-glucuronid (27H2.2), Apigenin-rutinosid (27H2.3)

sowie Diosmetin-rutinosid (27H2.4) und schließlich aus Fraktion 3 Rosmarinsäure (27H3.1).

**Luteolin-7-O- α -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucosid
(Luteolin-rutinosid) (27H1.1)**

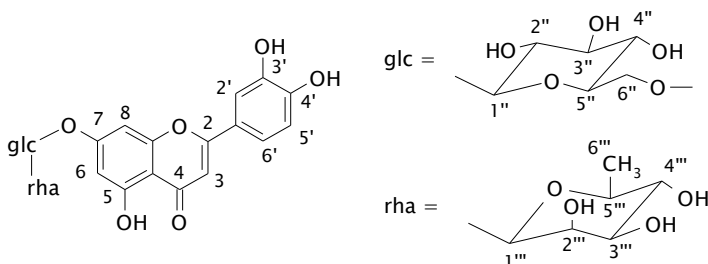


Abbildung 2.18: Struktur von 27H1.1

Das UV-Spektrum der Verbindung 27H1.1 zeigt in Acetonitril zwei Absorptionsbanden bei 254 und 350 nm. Im Massenspektrum findet sich im negativen Modus das Pseudomolekülion m/z 593 = $[M - H^+]$, im MS^2 das Ion m/z 285. Aus der Massendifferenz m/z 308 lässt sich der Verlust einer Desoxyhexose (m/z 164) und einer Hexose (m/z 180), jeweils unter Anlagerung eines Wassermoleküls, ableiten. Aufgrund ihrer Häufigkeit in der Natur handelt es sich bei den Zuckern vermutlich um Glucose und Rhamnose. Im positiven Modus findet sich neben dem entsprechenden Pseudomolekülion m/z 595 = $[M + H]^{++}$ und dem durch Verlust der Zucker entstehenden Ion m/z 287 im MS^3 auch noch ein Fragment m/z 449 im MS^2 . Die Massendifferenz m/z 146 entspricht der Abspaltung einer Desoxyhexose, unter Anlagerung eines Wassermoleküls.

Hieraus lässt sich ableiten, dass entweder beide Zucker an unterschiedlichen Stellen an das Aglykon gebunden sind, wobei die Bindung der

Hexose etwas stabiler ist, oder nur die Hexose an das Aglykon gebunden ist und die Desoxyhexose glykosidisch an die Hexose.

Das im negativen Modus im MS^2 auftretende Ion m/z 285 würde sowohl beim Flavonol Kämpferol als auch beim Flavon Luteolin zu finden sein. Anhand des UV-Spektrums und der weiteren Fragmentierung im MS^3 (negativ) mit den Fragmenten m/z 241, 217, 199, 175 und 151, kann durch Vergleich mit den Fragmentierungsdaten von Fabre et al. (2001) jedoch bereits jetzt auf das Flavon Luteolin als Aglykon geschlossen werden.

Bestätigt werden konnte dies mit Hilfe der 1H - und ^{13}C -Kernresonanzspektren. Das Protonenspektrum zeigt die Signale eines 1, 3, 4-substituierten Aromaten (B-Ring) in Form eines Multipletts im Bereich δ 7,39 – 7,47 ppm, das für die Protonen H2' und H6' integriert, und einem Dublett bei δ 6,92 ppm mit der Kopplungskonstante $J = 8,1$ Hz, das für H5' integriert. Diese Kopplungskonstante ist typisch für ortho-Kopplungen, also hier die Kopplung von H5' mit H6'. H6' seinerseits koppelt darüber hinaus noch mit H2'. Die hier zu erwartende kleinere Kopplung von etwa 2 Hz ist nicht zu erkennen, da eine Überlagerung der Signale von H6' und H2' auftritt. Kämpferol besitzt an dieser Stelle einen para-substituierten Aromaten. In diesem Bereich des Spektrums würden hier, aufgrund der chemischen Identität der Protonen H2' und H6' sowie H3' und H5', zwei Dubletts liegen, die jeweils für zwei Protonen integrieren. Als ebenfalls eindeutige Absicherung des Luteolins ist das Singulett bei δ 6,71 ppm anzusehen. Es integriert für das Proton H3, das bei Kämpferol nicht zu sehen wäre. Die Signale der Protonen H8 und H6 liegen bei δ 6,73 und 6,45 ppm. Sie zeigen eine Aufspaltung in Dubletts mit der für meta-Kopplungen typischen Kopplungskonstanten $J = 2,1$ Hz.

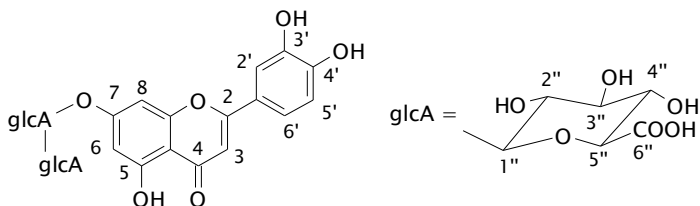
Im Bereich δ 3,10 – 3,90 ppm befinden sich die Signale der Zucker-Protonen als Multiplett. Lediglich die anomeren Protonen der Hexose und

der Desoxyhexose können zugeordnet werden. Bei δ 5,06 ppm liegt das anomere Proton der Hexose als Dublett. Die Kopplungskonstante von $J = 7,3$ Hz weist auf β -D-Glucose hin. Das anomere Proton der Desoxyhexose zeigt sich als breites Singulett bei δ 4,56 ppm. Es handelt sich demzufolge sehr wahrscheinlich um α -L-Rhamnose. Bei δ 1,07 ppm findet sich schließlich noch ein für die drei H6'''-Protonen der Rhamnose integrierendes Dublett mit der Kopplungskonstante $J = 6,3$ Hz.

Den größten Tieffeldshift im ^{13}C -Spektrum hat mit δ 181,8 ppm das Carbonyl-C-Atom C4 des Luteolins. Ebenfalls sehr weit tieffeld-verschoben sind die Signale der anderen an Sauerstoff gebundenen C-Atome C2, C7, C5, C9, C4' und C3'. Sie liegen im Bereich von δ 164,5 – 145,7 ppm. Auffällig ist die Verschiebung des C6''-Atoms der Glucose. Sie liegt bei δ 66,0 ppm. Aus dem Tieffeldshift von etwa 4 ppm gegenüber einer Bindung an eine freie OH-Gruppe ist ersichtlich, dass dieses C-Atom glykosidisch gebunden ist. Hieraus folgt, dass es sich bei der vorliegenden Verbindung um ein 1 \rightarrow 6-Disaccharid handelt und die beiden Zucker nicht einzeln an das Luteolin gebunden sind. Die Signale der anomeren C-Atome der Zucker befinden sich bei δ 99,9 und 100,4 ppm, wobei das direkt mit dem Aglykon verbundene C1'' der Glucose nicht so weit tieffeld-verschoben ist wie das der Rhamnose. Die restlichen Kohlenstoff-Atome der Zucker liegen im Bereich von δ 76,2 – 68,2 ppm. Das C-Atom C6''' der Rhamnose zeigt mit δ 17,7 ppm den geringsten Tieffeldshift.

Die Daten der MS-, ^1H - und ^{13}C -Spektren decken sich mit den von Wang et al. (2003) ermittelten Daten für Luteolin-7-O- α -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucosid.

Luteolin-7-O-diglucuronid (27H1.2)

**Abbildung 2.19:** Struktur von 27H1.2

Das UV-Spektrum von Verbindung 27H1.2 ist nahezu identisch mit dem von 27H1.1. Die Absorptionsmaxima liegen ebenfalls bei 254 und 350 nm.

Im Massenspektrum von 27H1.2 findet sich im negativen Modus das Pseudomolekülion $[M - H]^-$ mit m/z 637. Das Ion m/z 285 im MS^2 deutet wieder auf die Molekülmasse eines Aglykons hin. Aus der Differenz von m/z 352 lässt sich die Abspaltung zweier Hexosesäuren, vermutlich Glucuronsäuren (m/z 194), unter Anlagerung von zwei Wassermolekülen, herleiten. Diese Vermutung wird durch die Signale im positiven Modus unterstützt. Als Pseudomolekülion ist hier $[M + H]^+$ mit m/z 639 zu finden, im MS^2 m/z 463 und im MS^3 m/z 287. Die Massendifferenz von jeweils m/z 176 zwischen den Fragment-Ionen entspricht einer Abspaltung je eines Glucuronsäure-Moleküls.

Das 1H -NMR gibt Aufschluss über die Struktur des Aglykons. Die Signale zeigen im Bereich der aromatischen Verschiebungen ein vergleichbares Bild wie Verbindung 27H1.1. Noch deutlicher als dort ist der 1, 3, 4-substituierte B-Ring zu erkennen. Bei δ 7,49 ppm liegt ein Dublett mit einer Kopplungskonstante $J = 2,2$ Hz. Dieses stammt vom Proton H2'. H6' zeigt eine Aufspaltung in ein doppeltes Dublett bei δ 7,46 ppm mit den Kopplungskonstanten $J = 2,2$ Hz und 8,2 Hz. Schließlich findet sich

ein weiteres Dublett mit $J = 8,2$ Hz bei δ 6,94 ppm, das von Proton H5' stammt. Die Signale der Protonen des A-Ringes sind identisch mit denen von Verbindung 27H1.1. H8 spaltet bei δ 6,86 ppm in ein Dublett mit $J = 2,1$ Hz, H6 bei δ 6,55 ppm entsprechend ebenfalls in ein Dublett mit $J = 2,1$ Hz. Da sich bei einer Verschiebung von δ 6,63 ppm ein Singulett für das Proton H3 befindet, kann das Aglykon zweifelsfrei als Luteolin identifiziert werden.

Im Bereich zwischen δ 3,12 – 3,80 ppm befinden sich die als Multipletts aufgespaltenen Signale der Zucker-Protonen. Eine exakte Zuordnung ist nicht möglich, da sich die Signale der identischen Zucker stark überlagern. Lediglich die anomeren Protonen der beiden Zucker lassen sich festlegen. Sie liegen bei δ 4,20 und 4,57 ppm mit Kopplungskonstanten von $J = 7,0$ und $7,5$ Hz, was jeweils für β -D-konfigurierte Glucuronsäuren spricht. Etwas weiter tieffeld-verschoben ist dabei das anomere Proton des direkt mit dem Aglykon verbundenen Zuckers.

Da die Menge an isolierter Substanz für die Aufnahme eines ^{13}C -Spektrums nicht ausreichend war, können über die Bindungspositionen der einzelnen Strukturelemente nur Vermutungen geäußert werden. Aufgrund der Säurefunktion der beiden Zucker an der C6"-Position und der damit verbundenen sterischen Hinderung der C4"-Position, sind die Zucker untereinander wahrscheinlich 1 \rightarrow 2-glykosidisch verknüpft. Die Bindung an das Aglykon befindet sich vermutlich an Position 7-O des Luteolins. Die ebenfalls möglichen Bindungspositionen über 3'-O und 4'-O dürften durch die jeweilige Nachbarschaft einer OH-Gruppe sterisch ebenfalls benachteiligt sein. Auch eine Bindung über 5-O kann ausgeschlossen werden, da es hier durch die Nachbarschaft der Carbonyl-Funktion an C4 zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung kommt, die ein Abspalten des Protons verhindert. Unterstützt werden diese Vermutungen durch die Daten von Yoshida et al. (1993), die Luteolin-7-O- β -D-glucuronosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronid in *Perilla ocimoides* var.

crispa identifiziert haben und die Existenz dieser Verbindung in der Natur somit als bestätigt angesehen werden kann.

Eriodictyol-rutinosid (27H2.1)

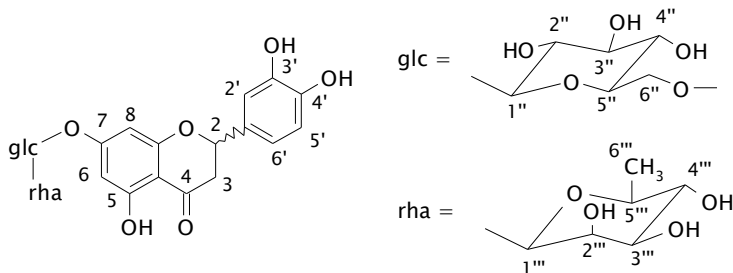
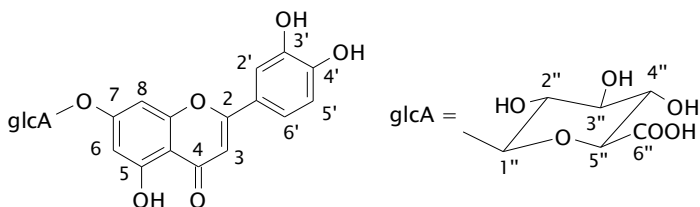


Abbildung 2.20: Struktur von 27H2.1

Verbindung 27H2.1 konnte nicht ganz sauber isoliert werden, sodass eine Auswertung der Kernresonanzspektren nicht möglich ist. UV- und Massenspektren lassen aber dennoch eine Identifizierung der Verbindung zu. So zeigen sich im UV-Spektrum die für Flavanone typischen Absorptionsmaxima bei 234 und 284 nm. Das Massenspektrum liefert im negativen Modus das Pseudomolekülion $[M - H]^+$ mit m/z 595 und im MS^2 das Fragment-Ion m/z 287. Die Massendifferenz m/z 308 ist identisch mit der beim Luteolin-rutinosid gefundenen, sodass auch hier von einer Abspaltung einer Desoxyhexose (Rhamnose) und einer Hexose (Glucose), unter Anlagerung von zwei Wassermolekülen, ausgegangen werden kann. Anhand des Fragments im MS^2 kann auf Eriodictyol als Aglykon geschlossen werden. Unterstützt wird diese Annahme u. a. durch die Arbeit von Areias et al. (2001), die Eriodictyol-rutinosid in Pfefferminze bereits nachgewiesen haben.

Luteolin-glucuronid (27H2.2)

**Abbildung 2.21:** Struktur von 27H2.2

Das UV-Spektrum von Verbindung 27H2.2 ist wieder identisch mit denen der Verbindungen 27H1.1 und 27H1.2. Die Absorptionsmaxima liegen ebenfalls bei 254 und 350 nm.

Auch die Massenspektren im negativen Modus sind weitgehend vergleichbar. Als Pseudomolekülion $[M - H]^+$ findet sich hier jedoch ein Signal m/z 461. Im MS^2 taucht wieder das Signal des Aglykons m/z 285 auf. Die Massendifferenz von m/z 176 spricht wieder für die Abspaltung eines Glucuronsäure-Restes, unter Anlagerung eines Wassermoleküls. Anhand des UV-Spektrums und des Fragmentierungsmusters im MS^3 kann durch Vergleich mit den Daten von Fabre et al. (2001) auf Luteolin als Aglykon geschlossen werden. Da aufgrund der geringen Substanzmenge keine kernresonanzspektroskopischen Daten aufgenommen werden konnten, ist eine Festlegung der Bindungsstelle von Aglykon und Glucuronsäure nicht möglich. Lu und Foo (2000), Stochmal et al. (2001) und Mitchell et al. (2001) haben beispielsweise das Luteolin-7-O- β -D-glucuronid bereits aus verschiedenen Pflanzen, wie Alfalfa oder Salbei, isoliert und identifiziert. Es ist somit recht wahrscheinlich, dass es sich hier ebenfalls um diese Verbindung handelt.

Apigenin-7-O- α -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucosid
(Apigenin-rutinosid, 27H2.3)

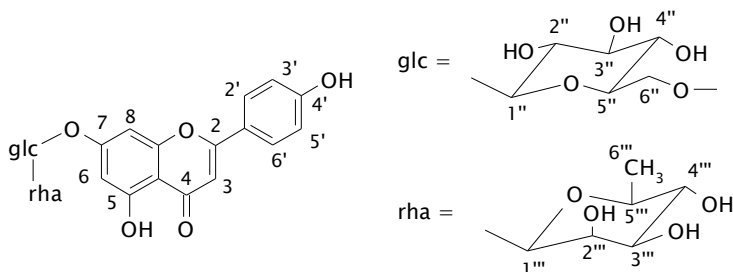


Abbildung 2.22: Struktur von 27H2.3

Das UV-Spektrum der Verbindung 27H2.3 zeigt in Acetonitril zwei Absorptionsmaxima bei 268 und 336 nm. Im Massenspektrum findet sich im negativen Modus das Pseudomolekülion $[M - H]^+$ mit m/z 577 und im MS^2 das Fragment m/z 269. Wie beim Luteolin-rutinosid ist die Massendifferenz hier ebenfalls m/z 308. Dies spricht somit auch hier für die Abspaltung einer Desoxyhexose und einer Hexose unter Anlagerung von zwei Wassermolekülen. Das UV-Spektrum und das Fragment-Ion im MS^2 deuten auf Apigenin als Aglykon hin.

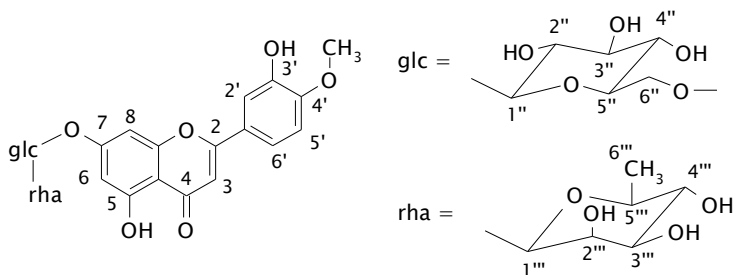
Als Zucker ist auch hier wieder das 1 \rightarrow 6 glykosidisch gebundene Disaccharid Rutinose (Rhamnose und Glucose) zu vermuten. Dies wird ebenso wie die anzunehmende Verknüpfung des Zuckers über die 7-O-Position des Apigenins durch das 1H -NMR-Spektrum gestützt, das in weiten Teilen dem des Luteolin-rutinosids gleicht. Bei δ 1,17 ppm liegt das für die drei $H_{6''}$ -Protonen der Rhamnose integrierende Dublett mit einer Kopplungskonstante von $J = 6,4$ Hz. Zwischen δ 3,46 und 4,10 ppm liegen die restlichen Zucker-Protonen. Das anomere Proton $H_{1''}$ der Rhamnose erscheint als breites Singulett bei δ 4,46 ppm. Dies bestätigt eine α -L-Konfiguration des Zuckers, wie sie für Rhamnose typisch ist. Das anomere Proton $H_{1''}$ der Glucose wird durch das für β -D-Zucker ty-

pische Dublett mit einer Kopplungskonstante $J = 7,4$ Hz bei δ 5,05 ppm abgebildet.

Die Protonen des A-Ringes des Apigenins liegen bei δ 6,53 ppm (H6) und 6,78 ppm (H8). Sie spalten jeweils als Dubletts mit $J = 2,0$ Hz. Das freie Proton H3 des C-Ringes liefert ein Singulett bei δ 6,66 ppm. Die Signale der B-Ring-Protonen zeigen das typische Bild eines 1, 4-substituierten Aromaten. Bei δ 6,96 ppm befindet sich ein für die beiden Protonen H3' und H5' integrierendes Dublett mit $J = 8,9$ Hz und bei δ 7,89 ppm liegt ebenfalls ein Dublett mit $J = 8,9$ Hz, das für H2' und H6' integriert.

Die große Ähnlichkeit der Signale der Zucker-Protonen mit denen des Luteolin-rutinosids und der Vergleich des NMR-Spektrums mit den von Kasaj et al. (2001) ermittelten Daten lassen den Schluss zu, dass es sich bei Verbindung 27H2.3 sehr wahrscheinlich um Apigenin-7-O- α -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucosid handelt. Da aufgrund der geringen Substanzmenge kein ^{13}C -NMR-Spektrum und auch keine Korrelationspektren aufgenommen werden konnten, kann diese Vermutung jedoch nicht abschließend verifiziert werden.

Diosmetin-7-O-rutinosid (27H2.4)

**Abbildung 2.23:** Struktur von 27H2.4

Verbindung 27H2.4 besitzt im UV-Spektrum zwei Absorptionsmaxima bei 252 und 348 nm. Das im negativen Modus aufgenommene Massenspektrum zeigt als Pseudomolekülion $[M - H]^+$ das Ion mit m/z 607. Im MS^2 findet sich das Fragment-Ion m/z 299 und im MS^3 das Ion m/z 285. Aus der Massendifferenz von m/z 308 zwischen MS und MS^2 lässt sich wiederum auf Rutinose als Zucker-Komponente schließen. Aus der weiteren Abspaltung des Fragments m/z 14 (CH_2) im MS^3 folgt das Vorhandensein einer OCH_3 -Gruppe im Molekül.

Das 1H -Spektrum der Verbindung unterstützt diese Vermutungen. Bei δ 1,25 ppm findet sich das für die drei $H_{6''}$ -Protonen der Rhamnose integrierende Signal. Die anomeren Protonen liegen bei δ 4,52 ppm und 5,00 ppm, wobei ersteres als breites Singulett erscheint und zur Rhamnose gehört (α -L-Konfiguration), letzteres als Dublett, mit einer Kopplungskonstante von $J = 7,4$ Hz, erscheint und zur Glucose gehört (β -D-Konfiguration). Im Bereich von δ 3,16 – 4,10 ppm befinden sich die Signale der restlichen Zucker-Protonen, die jedoch nicht weiter zugeordnet werden können.

Bei δ 3,93 ppm befindet sich ein weiteres, für drei Protonen integrierendes, Singulett. Es gehört zu den Protonen der OCH_3 -Gruppe des Aglykons. Die Signale der Protonen des A-Ringes befinden sich bei δ 6,60 (H6) und 6,83 ppm (H8), jeweils als Dubletts mit der Kopplungskonstante $J = 2,2$ Hz. Das freie Proton H3 des C-Rings erscheint als Singulett bei δ 6,71 ppm. Der B-Ring zeigt wieder das Bild eines 1, 3, 4-substituierten Aromaten mit einem für die beiden Protonen H2' und H6' integrierenden Multiplett und einem für H5' integrierenden Dublett mit $J = 8,4$ Hz bei δ 7,17 ppm.

Die Position der OCH_3 -Gruppe und die Bindungsstelle des Zucker-Restes an das Aglykon können mit den vorhandenen Daten nicht endgültig festgelegt werden. Da u. a. Areias et al. (2001) Diosmetin-rutinosid in Pfefferminze bereits nachgewiesen haben, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass es sich bei der hier isolierten Verbindung ebenfalls um Diosmetin-rutinosid handelt. Die OCH_3 -Gruppe befindet sich demnach an der 4'-Position im B-Ring. Damit ist aus sterischen Gründen auch die 7-O-Bindungsposition der Zucker die wahrscheinlichste.

Rosmarinsäure (27H3.1)

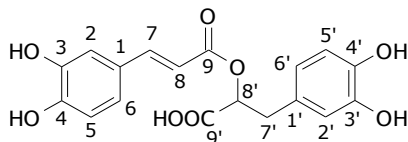


Abbildung 2.24: Struktur von 27H3.1

Verbindung 27H3.1 besitzt im UV-Spektrum zwei Absorptionsmaxima bei 242 und 330 nm. Das Massenspektrum zeigt im negativen Modus das Pseudomolekülion $[\text{M} - \text{H}^+]$ mit m/z 359. Im MS^2 finden sich die Fragment-Ionen m/z 223, 197, 179 und 161. Die Fragmente m/z 197 und 179

entstehen durch die Spaltung der Esterbindung zwischen C8' und dem Sauerstoff-Atom der zweiten Kaffeesäure. Durch weitere Wasserabspaltung entsteht schließlich das Fragment m/z 161. Aus diesem Fragmentierungsmuster und der Masse des Pseudomolekülions lässt sich bereits jetzt auf Rosmarinsäure schließen. Die Absicherung erfolgte über die ^1H - und ^{13}C -Spektren sowie den Vergleich der Ergebnisse mit den von Kuhn et al. (1994) ermittelten Daten für Rosmarinsäure.

Am auffälligsten im ^1H -Spektrum sind die beiden Dubletts mit $J = 15,9$ Hz bei δ 6,62 und 7,53 ppm. Die große Kopplungskonstante wird durch die Trans-Stellung der Protonen an der Doppelbindung zwischen C7 und C8 hervorgerufen. Am weitesten tieffeld-verschoben ist dabei das Proton H8 aufgrund der Nähe zur Säure- bzw. Estergruppe. Die Signale der Protonen H7' α , H7' β und H8' liegen am weitesten im hohen Feld und spalten jeweils in doppelte Dubletts. H7' β liegt bei δ 2,98 mit den Kopplungskonstanten $J = 8,8$ und 14,3 Hz, H7' α bei δ 3,10 mit $J = 4,0$ und 14,3 Hz und H8' bei δ 5,16 mit $J = 4,0$ und 8,8 Hz. Die Ring-Protonen H2, H5, H6 und H2', H5', H6' liegen im Bereich δ 6,62 bis 7,03 ppm, wobei letztere nicht ganz so weit tieffeld-verschoben sind. Die Signale der Protonen H6 und H6' spalten aufgrund ihrer Kopplung mit H5 bzw. H5' und H2 bzw. H2' in doppelte Dubletts und diese jeweils in einfache Dubletts. Die Kopplungskonstanten liegen für die ortho-Kopplungen bei $J = 8,4$ Hz (H5 – H6) und 8,1 Hz (H5' – H6'), für die meta-Kopplungen bei $J = 2,1$ Hz (H2 – H6) und 2,2 Hz (H2' – H6').

Am weitesten tieffeld-verschoben sind im ^{13}C -Spektrum die Carbonyl-C-Atome C9' (δ 175,0 ppm) und C9 (δ 168,7 ppm), gefolgt von den ebenfalls an Sauerstoff gebundenen C-Atomen C4, C3, C3' und C4' zwischen δ 149,6 und 145,1 ppm. Mit δ 146,8 ppm ebenfalls weit im tiefen Feld liegt das Signal von C7 aufgrund der Doppelbindung zu C8 und dem aromatischen Ringsystem in α -Stellung (konjugiertes System). C7' liegt wegen der fehlenden Doppelbindung mit δ 38,3 ppm dagegen am wei-

testen im hohen Feld. Ähnliches zeigt sich auch zwischen den C-Atomen C8 und C8'. C8' ist mit δ 75,8 ppm aufgrund der fehlenden Doppelbindung weniger weit tieffeld-verschoben als C8 (δ 115,1 ppm). Die aromatischen Kohlenstoffatome C1, C2, C5, C6 sowie C1', C2', C5' und C6' liegen im typischen Bereich von δ 115,3 bis 130,1 ppm.

3 Zusammenfassung

Antioxidative Aktivität und Phenolgehalte

Die antioxidativen Aktivitäten und die Phenolgehalte von 40 Kräuter- und Früchtetees, einem Grüntee und einem Schwarztee wurden ermittelt und mit Literaturdaten verglichen. Vermessen wurden sowohl wässrige Extrakte nach einem haushaltsüblichen Aufguss als auch methanolische Extrakte, bei denen von einer vollständigen Extraktion aller relevanten Verbindungen ausgegangen wird.

Die Ergebnisse zeigen eine gute Korrelation zwischen Phenolgehalt und antioxidativer Aktivität, d. h. dass bei hohem Phenolgehalt auch die antioxidative Aktivität hoch ist und umgekehrt. Mittlere bis hohe Phenolgehalte und antioxidative Aktivitäten finden sich bei Produkten aus Blüten, Blättern und Früchten wie z. B. bei Brombeerblättern, Lindenblüten und Holunderbeeren. Produkte aus Samen, Wurzeln und Rinden, wie etwa Fenchel, Ginseng oder Lapachorinde, zeigen dagegen eher niedrige Phenolgehalte und eine geringe antioxidative Aktivität. Eine Besonderheit stellt die Zimtrinde dar, die aufgrund ihrer hohen Gehalte an Hydroxyzimtsäuren und deren Derivaten ebenfalls eine sehr hohe antioxidative Wirksamkeit zeigt.

Neue Verbindungen aus Pfefferminze

Anhand von UV-, Massen- und Kernresonanzspektren konnten nach Isolierung zwei bisher in der Literatur nicht beschriebene Verbindungen aus Pfefferminze identifiziert werden. Es handelt sich um die Flavonglykoside Luteolin-glucuronid und Luteolin-diglucuronid.

Fünf weitere bereits bekannte Verbindungen wurden erstmals massenspektrometrisch mittels Electrospray-Ionisation und Iontrap-Detektion bis zum MS³ sowie durch Aufnahme von ¹H und teilweise ¹³C-NMR-Spektren identifiziert.

Quantitative Bestimmungen

Von Brombeerblättern, *Cistus incanus*, Himbeerblättern und Pfefferminze wurden die für die antioxidative Aktivität hauptsächlich verantwortlichen Substanzklassen Hydroxyzimtsäurederivate, Flavan-3-ole, neutrale und acide Flavanon- und Flavonol-O-glykoside sowie Flavon-C-glykoside quantitativ bestimmt.

In den zur selben Pflanzenfamilie gehörenden Brombeer- und Himbeerblättern wurden Hydroxyzimtsäurederivate, neutrale und acide Flavonol-O-glykoside gefunden. Ein gutes Unterscheidungsmerkmal zwischen beiden Produkten ist das Verhältnis von Hydroxyzimtsäurederivaten zu aciden Flavonol-O-glykosiden. Während bei Brombeerblättern beide Substanzklassen mit etwa 3 g/kg Trockenmasse vorliegen, wurden in Himbeerblättern etwas geringere Gehalte an Hydroxyzimtsäurederivaten (1 g/kg), aber dafür deutlich höhere Gehalte an aciden Flavonol-O-glykosiden ermittelt (> 7 g/kg im methanolischen Extrakt).

Bei *Cistus incanus* konnten neben Catechin, als einzigem Flavan-3-ol, einige Flavonol-O-glykoside bestimmt werden. Vor allem Myricetin-glykoside, die in keiner der anderen Proben nachgewiesen werden konnten, stellen hier, mit einem Gehalt von zusammen über 8 g/kg im methanolischen Extrakt, die Hauptverbindungen.

In Pfefferminze wurden Hydroxyzimtsäurederivate, acide und neutrale Flavanon- und Flavonol-O-glykoside quantifiziert. Bei den Hydroxyzimtsäuren ist mit fast 9 g/kg oder umgerechnet etwa 1 % im methanolischen

Extrakt die Rosmarinsäure als Hauptverbindung zu nennen. Der Gesamtgehalt der Flavon- und Flavanon-glykoside liegt bei etwa 3 %, bezogen auf die Trockenmasse.

Extraktionsversuche

Am Beispiel der Pfefferminze wurden exemplarisch verschiedene Extraktionsversuche durchgeführt. Um einen möglichst optimalen Stoffübergang antioxidativ wirksamer Verbindungen in den Teeaufguss zu erreichen, wurden dazu die Extraktionstemperatur und die Ziehzeit variiert. Als günstigste Kombination hat sich eine Ziehzeit von 10 Minuten bei einer Temperatur von 95 °C herausgestellt. Eine Verlängerung der Ziehzeit zeigte keine signifikante Zunahme an antioxidativer Aktivität der Aufgüsse.

Lagerversuche

Untersucht wurde die Veränderung der antioxidativen Aktivität von Brombeerblättern, *Cistus incanus*, Himbeerblättern und Pfefferminze über die Dauer von 9 bis 18 Monaten unter verschiedenen Lagerbedingungen. Eine geringe Tendenz zur Abnahme der antioxidativen Aktivität konnte lediglich bei *Cistus incanus* festgestellt werden.

4 Experimenteller Teil

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Chemikalien

ABTS (2,2'-Azinobis-[3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonsäure])
(Sigma Aldrich, Steinheim)

Acetonitril, HPLC (Acros Organics, New Jersey, USA)

Amberlite™ XAD™ 16 HP (Supelco, Bellefonte, USA)

Ammoniak-Lösung ca. 25%ig, p. A. (Riedel-de Haën, Seelze)

Ascorbinsäure, L(+), 99,5 %, f. analyt. Zwecke (Grüssing GmbH, Filsum)

Catechin, purum (Roth, Karlsruhe)

Chloroform, p. A. (Roth, Karlsruhe)

n-Chlorogensäure-Hemihydrat (5-Caffeoylchinasäureester), purum
(Fluka, Buchs, Schweiz)

Coffein, wasserfrei, purum (Fluka, Buchs, Schweiz)

p-Cumarsäure, CHR BCA (Roth, Karlsruhe)

N,N-Dimethylformamid, z. A. (Merck, Darmstadt)

Dimethylsulfoxid-d₆, 99,96 % Deuterierungsgrad (Deutero, Kastellaun)

Epicatechin, purum (Roth, Karlsruhe)

- Essigsäure, 99-100 %, 'Baker Analyzed'[®] HPLC Reagent
(Baker, Groß Gerau)
- Essigsäureethylester (Ethylacetat), p. A. (Merck, Darmstadt)
- Ethanol, ROTIPURAN[®], ≥99,8 %, p. A. (Roth, Karlsruhe)
- Ferulasäure, purum (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Folin-Ciocalteu-Reagenz (2N) (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Gallussäure Monohydrat, krist. reinst DAB6 (Merck, Darmstadt)
- Glaswolle (Merck, Darmstadt)
- Hesperetin-7-rutinosid, HPLC (Roth, Karlsruhe)
- n-Hexan, Fassware (Riedel-de Haën, Seelze)
- Kaliumperoxodisulfat (Kaliumpersulfat, $K_2S_2O_8$), p. A.
(Riedel-de Haën, Seelze)
- Kämpferol-3-rhamnoglucosid, HPLC (Roth, Karlsruhe)
- Methanol, Fassware, destilliert (Bayer, Leverkusen)
- Methanol, HPLC (Fisher Chemicals, Loughborough, Leics.)
- Methanol- d_4 , 99,8 % Deuterierungsgrad (Merck, Darmstadt)
- Myricetin-3-rhamnosid, HPLC (Roth, Karlsruhe)
- Naringenin-7-glucosid, HPLC (Roth, Karlsruhe)
- Natriumcarbonat, wasserfrei (Na_2CO_3), p. A. (Merck, Darmstadt)

Orientin, HPLC (Luteolin-8-C-glucosid) (Roth, Karlsruhe)

Pectinol 10 L, Enzym (Röhm, Darmstadt)

Polyamid SC 6 (0,05-0,16 mm) (Macherey-Nagel, Düren)

Quercetin-3-rutinosid Trihydrat (Rutin-Trihydrat), HPLC
(Roth, Karlsruhe)

Rosmarinsäure, HPLC (Roth, Karlsruhe)

RP-18 (Octadecyl C18) Festphasen-Kartuschen (BAKERBOND)
(J. T. Baker, Phillipsburg, USA)

Seesand, reinst (Merck, Darmstadt)

Trolox[®], purum (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
(Fluka, Buchs, Schweiz)

Vitexin, HPLC (Apigenin-8-C-glucosid) (Roth, Karlsruhe)

Wasser, für HPLC-Eluenten über Reinstwasseranlage (Barnstead
NANOpure[®], Werner, Bergisch Gladbach), Leitfähigkeit < 18 $\mu\text{S}/\text{cm}$;
sonst deionisiertes Wasser

4.1.2 Pflanzenmaterial

Sämtliche Untersuchungen wurden mit im Handel erhältlichen, für Kräuter- und Früchtetees üblichen, Feinschnitten der entsprechenden Pflanzen durchgeführt. Lediglich Brombeerstücke stellten einen gefriergetrockneten Extrakt des Saftes der Brombeerfrüchte dar. Die Proben wurden von den Mitgliedsfirmen der Wirtschaftsvereinigung Kräuter- und Früchtetee e. V. (WKf) zur Verfügung gestellt. Über spezielle Anbauregionen oder Ernteperioden der einzelnen Pflanzen ist nichts bekannt.

4.1.3 Geräte

4.1.3.1 Photometer

Die Bestimmung der antioxidativen Aktivität und der Gesamtphenole erfolgte auf folgenden Photometern:

- Lambda 3 UV/VIS Spectrophotometer (Perkin-Elmer, USA)
- Spectronic 301, Spectrophotometer (Milton Roy, USA)
- SPECORD UV/Vis S10 (Carl Zeiss, Jena)
- UV-2101PC, UV-Vis Scanning Spectrophotometer (Shimadzu, Japan)

4.1.3.2 HSCCC-Anlage

Anlage: PTR High Speed Countercurrent Chromatograph
Model CCC-1000, Triple-Coil (Pharma-Tech Research Corp., Baltimore, USA)

Probenaufgabe: 30 mL-Probenschleife

Pumpe:	System Gold Programmable Solvent Module 116 (Beckman Instruments, San Ramon, USA)
Detektor:	System Gold Programmable Detektor Module 166 (Beckman Instruments, San Ramon, USA)
Steuereinheit:	PC-8300 (NEC, Tokyo, Japan)
Fraktionensammler:	Super Fraction Collector SF-2120 (Advantec Toyo Kaisha Ltd., Japan)
Datenverarbeitung:	LSW Chromatography Station; Data Apex Ltd. V. 1.7

4.1.3.3 Analytische HPLC – Diodenarray-Detektor

Pumpe:	Series 1100 – Bin Pump G1312A (Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn)
Probenaufgabe:	Series 1100 – Autosampler ALS G1329A, ALS Therm G1330A (Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn)
Säulenofen:	Series 1100 – Colcom G1316A (Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn)
Detektor:	Series 1100 – DAD G1315A (Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn)
Datenverarbeitung:	ChemStation Software Version A.06.03 (Hewlett- Packard GmbH, Waldbronn)

4.1.3.4 Semipräparative HPLC – UV/Vis-Detektor

Gradientenformer:	Niederdruckgradientenformer Model 250 B (Gyn- koteK, Germering)
-------------------	--

Pumpe:	System Gold Programmable Solvent Module 116 (Beckman Instruments, San Ramon, USA)
Detektor:	System Gold Programmable Detektor Module 166 (Beckman Instruments, San Ramon, USA)
Steuereinheit:	PC-8300 (NEC, Tokyo, Japan)
Datenverarbeitung:	LSW Chromatography Station; Data Apex Ltd. V. 1.7

4.1.3.5 HPLC–Massenspektrometer

Pumpe:	Series 1100 – Bin Pump G1312A (Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn)	
Injektor:	Rheodyne 7725i mit 20 µL-Probenschleife (Rheodyne, Berkeley, USA)	
MS-Anlage:	Esquire~LC mit Elektrospray-Ionisierung (ESI) und Ion-Trap-Detektor (Bruker Daltonik GmbH, Bremen)	
MS-Parameter:	<u>LC-MS:</u>	
	Dry Gas Temp.:	365 °C
	Dry Gas Flow:	10,00 L/min
	Nebulizer Gas (N ₂):	50,0 psi
	Capillary:	+ 3500 V
	End Plate Offset:	- 500 V
	Skimmer 1:	- 30,0 V
	Skimmer 2:	- 5,0 V
	Cap Exit Offset:	- 70,0 V
	Trap Drive:	55
	Scan Range:	m/z 50 – 1500
	Accu Time:	200 ms

Spritzenproben:

Dry Gas Temp.:	300 °C
Dry Gas Flow:	4,00 L/min
Nebulizer Gas (N ₂):	10,0 psi

Ausgehend von den oben aufgeführten Parametern wurden die Einstellungen für die Kapillare, End Plate Offset, Skimmer, Cap Exit Offset und Trap Drive für die jeweils gemessene Verbindung optimiert. Bei Messungen im positiven Modus sind die Vorzeichen der aufgeführten Spannungsangaben der Kapillare, der Skimmer und des Cap Exit Offset umgekehrt.

Datenverarbeitung: Esquire Control Software V. 4.5, Bruker Data Analysis V. 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen)

4.1.3.6 Kernresonanzspektrometer

Lösungsmittel:	Methanol-d ₄ : 99,8 % Deuterierungsgrad Dimethylsulfoxid-d ₆ : 99,96 % Deuterierungsgrad
Kalibrierung:	jeweils auf das Restsignal des nicht deuterierten Teils des Lösungsmittels
Spektren:	¹ H (300 MHz) und ¹³ C (75 MHz); Verschiebung δ in ppm
Gerät:	FT-NMR Spektrometer Bruker AMX 300 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten)

4.1.4 Standardmethoden

4.1.4.1 Haushaltsüblicher Teeaufguss

Als haushaltsübliche Zubereitung wird folgender Aufguss definiert: Ca. 2 g Probe (genau gewogen) werden mit 200 mL siedendem Wasser aufgebüht. Nach einer Ziehzeit von 10 Minuten wird der Aufguss über ein Feinsieb abgesehen. Jeweils vier Extrakte werden vereinigt und weiter bearbeitet. Diese Zubereitung folgt dem Vorschlag der EHIA. Die so gewonnenen Extrakte werden auch als wässrige Extrakte bezeichnet.

4.1.4.2 Extrahierbare Feststoffe

Jeweils 50 mL des haushaltsüblichen Teeaufgusses werden nach Abkühlen in ein 100 mL-Becherglas pipettiert und bei 103 °C im Trockenschrank bis zur Massenkonstanz getrocknet.

4.1.4.3 Methanolische Extraktion

Die methanolische Extraktion erfolgt analog der ISO-Norm ISO/CD 14502-1. Es wird davon ausgegangen, dass bei dieser Form der Extraktion alle relevanten Verbindungen vollständig extrahiert werden.

0,2 g fein gemahlene Probe (Partikelgröße < 0,5 mm) werden mit 5 mL 70 °C heißem, 70%igem Methanol übergossen und für genau 10 Minuten im Wasserbad auf 70 °C erhitzt. Zu Beginn der Extraktion, nach 5 Minuten und am Ende wird gründlich durchmischt. Am Ende der Extraktionszeit wird der Extrakt auf Raumtemperatur abgekühlt und bei 3500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird in einen 10 mL-Messkolben dekantiert und der Rückstand noch einmal mit 5 mL Lösungsmittel für genau 10 Minuten extrahiert, abgekühlt und zentrifugiert. Der Überstand wird ebenfalls in den 10 mL-Messkolben dekantiert und dieser bis zur Marke mit 70%igem Methanol aufgefüllt.

4.1.4.4 Gesamtphenol-Bestimmung

Die Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes erfolgt als Summenparameter nach einer Modifikation der Methode von Singleton und Rossi (1965) und Singleton et al. (1999). Die Methodik wird in der Ausführungsform durchgeführt, die für Tee derzeit international genormt wird (ISO/CD 14502-1). Das Prinzip der Methode beruht auf der leichten Oxidierbarkeit phenolischer Verbindungen. Molybdat- und Wolframationen bilden zusammen mit Phosphorsäure (Folin-Reagenz) im alkalischen Milieu Komplexe, die sich leicht zu blauen Farbpigmenten reduzieren lassen. Die Stärke der Färbung ist proportional der Menge an oxidierbaren Verbindungen einer Probelösung. Als Vergleichssubstanz dient Gallussäure, die Messwellenlänge beträgt 765 nm.

Herstellen der Arbeitslösungen und Standards

Das im Handel erhältliche 2N Folin-Ciocalteu-Reagenz wird vor der Bestimmung 1:10 verdünnt. Dazu werden 20 mL in einen 200 mL-Messkolben überführt und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

Als Pufferlösung dient 7,5%ige Natriumcarbonatlösung. 37,5 g wasserfreies Na_2CO_3 werden in einen 500 mL-Messkolben eingewogen und zunächst in ca. 250 mL Wasser gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wird bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt.

Zum Ansetzen der Stammlösung für die Kalibrierung werden 0,110 g Gallussäure-Monohydrat in einen 100 mL-Messkolben möglichst genau eingewogen und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Dies entspricht einer Einwaage von ca. 1 mg/mL wasserfreier Gallussäure. Von dieser Stammlösung werden nun 1, 2, 3, 4 und 5 mL in je einen 100 mL-Messkolben pipettiert und bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt. Die Konzentrationen der Kalibrierlösungen entsprechen somit 10, 20, 30, 40 und

50 $\mu\text{L/mL}$ Gallussäure. Alle Arbeitslösungen werden täglich frisch hergestellt.

Messung

Gemessen werden die wässrigen Extrakte gemäß Abschnitt 4.1.4.1 zunächst nach einer 1:10-Verdünnung und die methanolischen Extrakte gemäß Abschnitt 4.1.4.3 nach einer 1:100-Verdünnung. Liegen später bei der Messung die Werte einzelner Proben außerhalb der Kalibrierung, werden diese für eine weitere Messung entsprechend mehr oder weniger stark verdünnt.

Der Reaktionsansatz erfolgt jeweils als Doppelbestimmung in 10 mL-Messkolben. Von sämtlichen Kalibrier- und Extraktlösungen wird jeweils 1 mL vorgelegt. Zusätzlich wird ein Blindwert mit 1 mL Wasser angesetzt. Anschließend wird jeder Kolben über einen Dispenser mit 5 mL der Folin-Ciocalteu-Arbeitslösung und innerhalb von 3 – 8 Minuten mit 4 mL der 7,5%igen Natriumcarbonatlösung versetzt. Nach gründlichem Durchmischen werden die Kolben für 60 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann in 10 mm-Küvetten bei 765 nm photometrisch vermessen.

4.1.4.5 Bestimmung der antioxidativen Kapazität

Die Bestimmung der antioxidativen Kapazität erfolgt in Anlehnung an den von Re et al. (1999) entwickelten modifizierten TEAC-Test. Dieser beruht auf einer durch antioxidativ wirksame Verbindungen hervorgerufenen Entfärbung einer ABTS-Radikal-Kationen-Lösung. Da bei den untersuchten Proben Matrix-Effekte eine Rolle spielen, wurde die beschriebene Vorgehensweise den gegebenen Bedingungen wie folgt angepasst.

Erzeugung des ABTS^{•+}-Radikals

38,41 mg ABTS (7 mmol) werden mit 6,63 mg (2,45 mmol) Kaliumperoxodisulfat (Kaliumpersulfat, $K_2S_2O_8$) in 10 mL Wasser gelöst und zur Bildung des Radikals für 12 – 16 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Danach kann die Lösung für ca. sechs Wochen im Kühlschrank dunkel aufbewahrt werden.

Zum Herstellen der täglich frisch anzusetzenden Arbeitslösung werden 0,5 mL dieser Stammlösung mit ca. 50 mL Ethanol (p. A., $\geq 99,8\%$) versetzt und auf eine Extinktion von 0,70 \pm 0,02 eingestellt.

Kalibrierung

Zur Kalibrierung wird eine Verdünnungsreihe der Standardsubstanz Trolox[®], einem wasserlöslichen Vitamin-E-Derivat, erstellt und vermessen. Dazu werden 12,5 mg Trolox[®] in einen 10 mL-Messkolben eingewogen und mit Ethanol (p. A., $\geq 99,8\%$) bis zur Marke aufgefüllt (5 mmol/L). Von dieser Stammlösung werden 250 μ L, 500 μ L, 750 μ L und 1000 μ L in je einen 5 mL-Messkolben überführt und ebenfalls mit Ethanol (p. A., $\geq 98\%$) bis zur Marke aufgefüllt (entspricht bei der Messung Konzentrationen von 0,25 mmol/L, 0,50 mmol/L, 0,75 mmol/L und 1,00 mmol/L).

Die Kalibrierung wird vor jeder Messreihe mit der frisch hergestellten ABTS-Arbeitslösung durchgeführt.

Messung

Gemessen werden die wässrigen Extrakte gemäß Abschnitt 4.1.4.1 zunächst unverdünnt und die methanolischen Extrakte gemäß Abschnitt 4.1.4.3 nach einer 1:10-Verdünnung. Liegen später bei der Messung die

Werte einzelner Proben außerhalb der Kalibrierung, werden diese für eine weitere Messung entsprechend mehr oder weniger stark verdünnt.

Jeweils 20 μL Standard bzw. Probe werden in Halbmikroküvetten (Kunststoff, Schichtdicke 10 mm) vorgelegt, mit 1,5 mL ABTS-Arbeitslösung versetzt und gründlich durchmischt. Nach genau 10 Minuten Reaktionszeit wird die Extinktion der Lösungen bei 734 nm gegen Luft vermessen. Von der Kalibrierreihe wird jeweils nur eine Messung pro Standard durchgeführt, die Proben werden einer Dreifach- oder Vierfachbestimmung unterzogen.

Zur Kontrolle wird bei jeder Messreihe ein Ascorbinsäure-Vergleichsstandard mit vermessen. Dazu werden 4,41 mg Ascorbinsäure in einen 50 mL-Messkolben eingewogen und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt (entspricht 1 mmol/L bei einem eingesetzten Probenvolumen von 20 μL). Diese Lösung ist täglich frisch anzusetzen. Die Messung erfolgt analog der Kalibrierung und der Proben. Die gesamte Messung findet bei Raumtemperatur statt.

4.1.4.6 Extraktion zur Gewinnung von Reinsubstanzen

Die Extraktion zur Gewinnung von Reinsubstanzen aus Pfefferminze wurde mit 50 g des Feinschnitts unter Rühren mit 750 mL 70%igem Methanol bei 60 °C für eine Stunde durchgeführt. Nach Filtration wurde das mit extrahierte Chlorophyll mit je 3×50 mL n-Hexan ausgeschüttelt, die Hexanphasen wurden verworfen. Aus den wässrigen Phasen wurde anschließend am Rotationsverdampfer das Methanol vollständig entfernt und der wässrige Rückstand gefriergetrocknet.

4.1.4.7 Reinigung des Rohextraktes über Amberlite™ XAD™-16HP

Die weitere Aufarbeitung des Rohextraktes, auch im Hinblick auf eine mögliche industrielle Nutzung, wurde mit dem für Lebensmittel zugelassenen nicht-ionischen Polystyrolharz Amberlite™ XAD™-16HP durchgeführt (Säule: 55 × 5 cm, ca. 650 g XAD™-16HP). Nach Konditionierung mit ca. 2,5 L Wasser wurden pro Durchgang bis zu 7 g Rohextrakt (gelöst in ca. 20 mL Wasser) aufgegeben werden. Zum Adsorbieren wurde der Extrakt für ca. 30 Minuten auf der Säule belassen, um anschließend mit ca. 2,5 L Wasser gewaschen und schließlich mit ca. 2 L Methanol eluiert zu werden. Das methanolische Eluat wurde schließlich am Rotationsverdampfer vollständig vom Lösungsmittel befreit und nach Zusatz von Wasser gefriergetrocknet. Um eine Überladung des Säulenmaterials oder sonstige Verluste durch den Spülschritt erkennen zu können, wurde die Spülflüssigkeit nach Gefriertrocknung per HPLC-MS/MS nach der in Abschnitt 4.1.5.5 beschriebenen Methode für Flavonol-O-glykoside vermessen.

4.1.4.8 High-Speed Countercurrent Chromatography

Das gefriergetrocknete methanolische XAD™-16HP-Eluat der Pfefferminze wurde einer Vortrennung über HSCCC unterzogen. Die Messwellenlänge 244 nm am UV-Detektor wurde durch eine Messung des Extraktes mit der unter Abschnitt 4.1.5.5 beschriebenen HPLC-DAD-Methode ermittelt. Bei dieser Wellenlänge werden alle relevanten Verbindungen detektiert, jedoch stellt sie keine optimale Wellenlänge für bestimmte Substanzen oder Substanzklassen dar.

Zweiphasensystem: Chloroform/Methanol/Wasser (7 : 13 : 8; v/v/v)

Modus: Head to Tail (stationäre Phase: leichte Phase)

Einwaage (Probe): 0,8 g

Injektionsvolumen:	30 mL
Fluss:	2,8 mL/min
Messwellenlänge:	244 nm

4.1.4.9 Semipräparative HPLC

Mit den HSCCC-Fractionen der Pfefferminze wurden zur Isolierung einzelner Verbindungen semipräparative Trennungen per HPLC durchgeführt. Die Messwellenlänge für die Trennungen wurde von der HSCCC übernommen.

Fließmittel:	A: 2%ige Essigsäure B: 100 % Acetonitril
Messwellenlänge:	244 nm
Trennsäule:	Aqua 250 × 4,6 mm i. D. mit Vorsäulenkartusche „SecurityGuard“ C-18, 4 × 3 mm i. D. (Pheomenex®, Aschaffenburg)
Fluss:	1 mL/min
Gradient A:	mit 3 % B 20 min isokratisch mit 10 % B 20 min isokratisch mit 20 % B 10 min isokratisch mit 50 % B 10 min isokratisch mit 100 % B 15 min isokratisch
Gradient B:	mit 3 % B 10 min isokratisch mit 10 % B 10 min isokratisch mit 20 % B 15 min isokratisch mit 35 % B 10 min isokratisch mit 50 % B 10 min isokratisch mit 100 % B 15 min isokratisch

4.1.5 Standardarbeitsvorschriften

4.1.5.1 Trockenmasse

Zur Bestimmung der Trockenmasse von Brombeerblättern, *Cistus incanus*, Himbeerblättern und Pfefferminze wurden in Doppelbestimmung jeweils 2 g Probe in ein Becherglas genau eingewogen und bei 103 °C im Trockenschrank bis zur Massenkonstanz getrocknet. Die Ergebnisse finden sich im Anhang in Abschnitt A.VI.

4.1.5.2 Bestimmung von Flavan-3-olen (Catechine)

Die wässrigen Extrakte wurden nach Membranfiltration direkt per HPLC-DAD vermessen, die methanolischen Extrakte zuvor 1 : 5 verdünnt.

Fließmittel:	A: 2 % Essigsäure, 9 % Acetonitril, aq. B: 80 % Acetonitril, aq.
Fluss:	1 mL/min
Messwellenlänge:	278 nm
Temperatur:	35 °C
Injektionsvolumen:	20 µL
Trennsäule:	Luna, Phenyl-Hexyl, 5 µm, 250 × 4.6 mm i. D. mit Phenyl-Vorsäulenkartusche 4 × 3 mm i. D. (Phenomenex®, Aschaffenburg)
Gradient:	mit 0 % B 15 min isokratisch in 15 min auf 32 % B 5 min isokratisch – Ende der Datenerfassung: 35 min

in 1 min auf 100 % B
 9 min mit 100 % B spülen
 in 1 min auf 0 % B
 20 min mit 0 % B konditionieren – Methodenende:
 66 min

Standards: Coffein (Konzentration: 2,006 mg/mL)

STD A: 50,15 µg/mL

STD B: 100,30 µg/mL

STD C: 150,45 µg/mL

Retentionszeiten/

Responsefaktoren:	Gallussäure (GA)	4,16 min	RRF = 0,84
	EGC	8,46 min	RRF = 11,24
	Catechin (+C)	10,93 min	RRF = 3,58
	Coffein	15,07 min	RRF = 1
	EC	18,24 min	RRF = 3,67
	EGCG	21,26 min	RRF = 1,72
	ECG	27,51 min	RRF = 1,42

Berechnung:
$$x \text{ [mg/kg]} = \frac{(y - b) \cdot \text{RRF}_{\text{STD}} \cdot V \cdot d}{m \cdot \text{EW} \cdot 100 \cdot \text{TM}}$$

y	Peakfläche des Catechins in der Probe
b	y-Achsenabschnitt der Kalibriergeraden
RRF_{STD}	relativer Responsefaktor des jeweiligen Catechins
V	Extraktionsvolumen der Probe (800 mL bei wässrigen Extrakten, 10 mL bei methanolischen Extrakten)
d	Verdünnungsfaktor (1 bei wässrigen Extrakten, 5 bei methanolischen Extrakten)
m	Steigung der Kalibriergeraden

EW	Einwaage der Probe (8 g bei wässrigen Extrakten, 0,2 g bei methanolischen Extrakten)
TM	Trockenmasse in Prozent
Nachweisgrenze:	Eine Coffein-Standardlösung wurde soweit verdünnt, bis die Peakhöhe dem fünffachen Grundrauschen entsprach. Diese Konzentration wurde als Nachweisgrenze festgelegt.

4.1.5.3 Bestimmung von Rosmarinsäure

Die Rosmarinsäure aus Pfefferminze wurde aus den Chromatogrammen der Flavan-3-ole quantifiziert. Die Standards wurden wie hier beschrieben hergestellt und unter identischen Bedingungen vermessen (s. Abschnitt 4.1.5.2).

Standard: Rosmarinsäure, $C_{18}H_{16}O_8$, $M_r = 360,34$ g/mol

Konzentration: 0,6090 g/L

Verdünnungen: 1:10, 1:20, 1:25, 1:50, 1:100

Berechnung:
$$x \text{ [mg/kg]} = \frac{(y - b) \cdot V \cdot d}{m \cdot EW \cdot 100 \cdot TM}$$

y	Peakfläche der Rosmarinsäure in der Probe
b	y-Achsenabschnitt der Kalibriergeraden
V	Extraktionsvolumen der Probe (800 mL beim wässrigen Extrakt, 10 mL beim methanolischen Extrakt)
d	Verdünnungsfaktor (1 beim wässrigen Extrakt, 5 beim methanolischen Extrakt)
m	Steigung der Kalibriergeraden

EW	Einwaage der Probe (8 g bei wässrigen Extrakten, 0,2 g bei methanolischen Extrakten)
TM	Trockenmasse in Prozent

Nachweisgrenze: Eine Rosmarinsäure-Standardlösung wurde so weit verdünnt, bis die Peakhöhe dem fünffachen Grundrauschen entsprach. Diese Konzentration wurde als Nachweisgrenze festgelegt.

4.1.5.4 Bestimmung von Hydroxyzimtsäure-Derivaten (Chlorogensäuren)

Aufarbeitung der wässrigen Extrakte

Zu Beginn der Aufarbeitung (Festphasen-Extraktion) mussten die verwendeten RP-18-Kartuschen (pro Probe 2: A+B; Bakerbond 500 mg) mit 9 mL Methanol und anschließend 6 mL Wasser konditioniert werden. Danach wurde pro Kartusche 1 mL wässriger Extrakt aufgeben und in einen 50 mL-Spitzkolben eluiert (Supelco-Vakuumkammer). Um die Hydroxyzimtsäuren quantitativ zu eluieren, wurde die Kartusche mit 9 mL Wasser gewaschen, das Eluat ebenfalls im Spitzkolben auffangen. Die Konditionierung der Kartusche, die Probenaufgabe und die Elution wurden pro Probe insgesamt viermal durchgeführt!

Das Eluat (40 mL) wurde anschließend am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt, der Rückstand mit 1 mL Wasser aufgenommen und im Ultraschallbad gelöst. Mit einer Pasteurpipette wurde die Lösung dann in einen 2 mL-Messkolben überführt und der Spitzkolben erneut mit 1 mL Wasser gespült und ebenfalls in den Messkolben überführt. Schließlich wurde der Messkolben mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Die Lösungen wurden ohne weitere Membranfiltration direkt zur HPLC-DAD-Messung eingesetzt.

Aufarbeitung der methanolischen Extrakte

Vom hergestellten Methanolextrakt wurden 5 mL in einen 50 mL-Spitzkolben pipettiert und am Rotationsverdampfer soweit eingengt, bis die Lösung methanolfrei war. Der methanolfreie Rückstand wurde mit Wasser quantitativ in einen 10 mL-Messkolben überführt und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Festphasenextraktion erfolgte mit dieser Lösung analog der wässrigen Extrakte.

Fließmittel:	A: 2%ige Essigsäure B: 100 % Acetonitril
Fluss:	1 mL/min
Messwellenlänge:	324 nm
Temperatur:	20 °C
Injektionsvolumen:	20 µL
Trennsäule:	ODS-Hypersil, 5 µm, 250 × 4,6 mm i. D., mit Vorsäule Nucleosil 100, C-18, 5 µm, 10 × 4,6 mm i. D. (Techlab, Erkerode)
Gradient:	mit 6 % B 15 min isokratisch in 5 min auf 12 % B 25 min isokratisch mit 12 % B in 1 min auf 100 % B 10 min mit 100 % B spülen in 1 min auf 6 % B – Ende der Datenerfassung: 60 min 20 min konditionieren – Methodenende: 77 min

- Standards:
- a) p-Cumarsäure, $C_9H_8O_3$, $M_r = 164,16 \text{ g/mol}$
 - b) n-Chlorogensäure-Hemihydrat (5-Caffeoyl-chinasäureester), $C_{16}H_{18}O_9 \cdot 0,5 H_2O$, $M_r = 363,32 \text{ g/mol}$ (wasserfrei: $354,32 \text{ g/mol}$)
 - c) Ferulasäure, $C_{10}H_{10}O_4$, $M_r = 194,19 \text{ g/mol}$

- Konzentrationen: Einwaage in 25 mL-Messkolben:
- a) $0,01527 \text{ g} \equiv 0,6108 \text{ g/L}$ p-Cumarsäure
 - b) $0,01548 \text{ g} \equiv 0,6192 \text{ g/L}$ n-Chlorogensäure-Hemihydrat ($0,6039 \text{ g/L}$ n-Chlorogensäure (5-CQA))
 - c) $0,01509 \text{ g} \equiv 0,6036 \text{ g/L}$ Ferulasäure

Verdünnungen: 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400

Umrechnung von p-Cumarsäure zu 3-/4-/5-CouQA:

p-Cumarsäure:	164,16 g/mol
Chinasäure:	192,17 g/mol
CouQA-ester:	338,33 g/mol
Faktor:	2,06

Umrechnung von Ferulasäure zu 3-/4-/5-FQA:

Ferulasäure:	194,19 g/mol
Chinasäure:	192,17 g/mol
FQA-ester:	368,36 g/mol
Faktor:	1,90

Umrechnung von Ferulasäure zu Ferulasäureglucosid/Feruloylglucose:

Ferulasäure:	194,19 g/mol
Ferulasäureglucosid:	356,37 g/mol
Faktor:	1,84

Umrechnung von n-Chlorogensäure zu 3-/4-/5-CQA:

Faktor:	1,00
---------	------

Umrechnung von n-Chlorogensäure zu 3,4-/3,5-/4,5-di-CQA:

n-Chlorogensäure:	354,32 g/mol
Kaffeesäure:	180,16 g/mol
di-CQA-ester:	516,48 g/mol
Faktor:	1,46

Umrechnung von n-Chlorogensäure zu Kaffeesäureglucosid/Caffeoyl-glucose:

n-Chlorogensäure:	354,32 g/mol
Kaffeesäure:	180,16 g/mol
Kaffeesäureglucosid:	342,34 g/mol
Faktor:	0,97

Berechnung: $x \text{ [g/kg]} = \frac{(y-b) \cdot \text{RRF} \cdot \text{VF}}{m \cdot \text{EW}}$

y	Peakfläche
b	y-Achsenabschnitt
RRF	Relative Response Factor der jeweiligen Verbindung
VF	Verdünnungsfaktor
m	Steigung
EW	Einwaage in [g]

Nachweisgrenze: Eine 5-CQA-Standardlösung wurde soweit verdünnt, bis die Peakhöhe dem fünffachen Grundrauschen entsprach. Diese Konzentration wurde als Nachweisgrenze festgelegt.

4.1.5.5 Bestimmung von Flavon-, Flavanon- und Flavonol-O-glykosiden

Polyamid-Säulenchromatographie

Die Vorkonditionierung des Polyamids erfolgte nach der Methode von Finger (1991). 1,2 kg Polyamid SC 6 werden dabei mit ca. 8 L Wasser und 1,5 L Methanol versetzt, gut durchmischt und über Nacht absetzen gelassen. Der Überstand wird entfernt, der Vorgang ab Methanolzugabe zweimal wiederholt und das Polyamid unter Methanol stehen gelassen.

Eine Glassäule (15 × 2 cm i. D.) wird mit Glaswolle, Seesand, vorgequollenem Polyamid (Füllhöhe: 10 cm) und erneut Glaswolle beschickt. Nach Konditionieren mit 250 mL Wasser kann die Probenaufgabe erfolgen.

Aufarbeitung

Von den wässrigen Extrakten wurden jeweils 50 mL direkt auf die PA-Säule aufgegeben, von den methanolischen Extrakten wurden zunächst jeweils 5 mL in einen 50 mL-Spitzkolben pipettiert und am Rotationsverdampfer fast bis zur Trockne eingengt. Der methanolfreie Rückstand wurde dann mit Wasser quantitativ auf die vorbereiteten PA-Säulen überführt.

Die Säule wurde anschließend mit 100 mL Wasser gewaschen, die Waschflüssigkeit verworfen. Dann wurden mit 250 mL Methanol die FOG eluiert und anschließend mit weiteren 250 mL 0,5%ig ammoniakalischem Methanol die aciden FOG. Die Eluate wurden jeweils fast zur Trockne eingengt, mit 4 mL DMF in einen 10 mL Messkolben überführt und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Nach Membranfiltration wurden die erhaltenen Eluate per HPLC-DAD vermessen.

Fließmittel	A: 2%ige Essigsäure B: 100 % Acetonitril
Fluss:	1 mL/min
Messwellenlänge:	354 nm
Temperatur:	20 °C
Injektionsvolumen:	50 µL
Trennsäule:	Nucleosil 100, C-18, 5 µM, 250 × 4,6 mm i. D. mit Vorsäule Nucleosil 100, C-18, 5 µm, 10 × 4,6 mm i. D. (Techlab, Erkerode)
Gradient:	6 % B in 28 min auf 17 % B in 25 auf 20 % B 12 min isokratisch mit 20 % B in 5 min auf 100 % B – Ende der Datenerfassung: 70 min 15 min isokratisch mit 100 % B in 1 min auf 6 % B Säule 20 min konditionieren – Methodenende: 106 min
Standards:	a) Kämpferol-3-rhamnoglucosid, $C_{26}H_{30}O_{15}$ $M_r = 582,51$ g/mol b) Rutin (Quercetin-3-rutinosid), $C_{27}H_{30}O_{16}$ $M_r = 610,50$ g/mol (hier verwendet: Rutin-Tri- hydrat: $M_r = 664,58$ g/mol) c) Myricitrin (Myricetin-3-rhamnosid), $C_{21}H_{20}O_{12}$ $M_r = 464,36$ g/mol

d) Apigenin-8-C-glucosid (Vitexin), $C_{21}H_{20}O_{10}$,
 $M_r = 432,38 \text{ g/mol}$

e) Luteolin-8-C-glucosid (Orientin), $C_{21}H_{20}O_{11}$,
 $M_r = 448,38 \text{ g/mol}$

f) Naringenin-7-O-glucosid, $C_{21}H_{22}O_{10}$,
 $M_r = 434,39 \text{ g/mol}$

g) Hesperetin-7-O-rutinosid, $C_{28}H_{34}O_{15}$
 $M_r = 610,56 \text{ g/mol}$

Umrechnung vom Glykosid zum Aglykon:

$$EW_{(\text{Aglykon})} [\text{mg}] = \frac{EW_{(\text{Glykosid})} [\text{mg}] \cdot M_r (\text{Aglykon})}{M_r (\text{Glykosid})}$$

$M_r (\text{Kämpferol}) = 286,24 \text{ g/mol}$

$M_r (\text{Quercetin}) = 302,24 \text{ g/mol}$

$M_r (\text{Myricetin}) = 318,24 \text{ g/mol}$

$M_r (\text{Apigenin}) = 270,24 \text{ g/mol}$

$M_r (\text{Luteolin}) = 286,24 \text{ g/mol}$

$M_r (\text{Naringenin}) = 272,25 \text{ g/mol}$

$M_r (\text{Hesperetin}) = 302,28 \text{ g/mol}$

Mischstandard 1: Kämpferol: 72,0 mg/L

Quercetin: 88,4 mg/L

Myricetin: 86,8 mg/L

Mischstandard 2: Apigenin: 69,4 mg/L

Luteolin: 74,7 mg/L

Mischstandard 3: Naringenin: 137,9 mg/L

Hesperetin: 151,0 mg/L

Verdünnungen: 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:100

Berechnung als Glykosid:

$$\text{Glykosid [mg/kg]} = \frac{(y - b) \cdot VF \cdot 1000}{m \cdot EW} \cdot \frac{M_r(\text{Glykosid})}{M_r(\text{Aglykon})}$$

y	Peakfläche
b	Achsenabschnitt
VF	Verdünnungsfaktor
m	Steigung
EW	Einwaage in [g]

Nachweisgrenze: Eine Rutin-, eine Orientin- und eine Naringenin-glucosid-Standardlösung wurden soweit verdünnt, bis die Peakhöhen jeweils dem fünffachen Grundrauschen entsprachen. Diese Konzentrationen wurden als Nachweisgrenzen festgelegt.

4.1.5.6 Bestimmung von Flavon-C-glykosiden

Probenaufarbeitung der wässrigen FCG

Von der restlichen Lösung der wässrigen FOG-Aufarbeitung wurden 5 mL in einen 50 mL Spitzkolben pipettiert und am Rotationsverdampfer bei 40 °C fast bis zur Trockne eingengt. Zur Hydrolyse wurden 2 mL Pectinol 10 L und 1 mL Wasser zugesetzt, im Ultraschallbad gelöst und 20 Stunden im Wasserbad bei 36 °C inkubiert. Eine Glassäule wurde mit Glaswolle, Seesand und ca. 8 cm vorgequollenem Polyamid befüllt und mit 250 mL Wasser methanolfrei gewaschen. Die hydrolysierte Probe wurde im Ultraschallbad gelöst, quantitativ auf die PA-Säule aufgeben und diese erneut mit 100 mL Wasser gewaschen. Anschließend wurden die FCG mit 250 mL Methanol in einen 500 mL Rundkolben eluiert. Nun wurde das Eluat am Rotationsverdampfer bei 40 °C fast bis zur Trockne

eingengt und mit 3×10 mL Methanol in einen 100 mL Rundkolben überführt. Nach Zusatz von 0,4 mL DMF wurde fast bis zur Trockne eingengt, der Rückstand mit weiteren 0,4 mL DMF und wenig Wasser in einen 2 mL Messkolben überführt und bis zur Marke aufgefüllt. Nach Membranfiltration folgte die Messung per HPLC-DAD.

Probenaufarbeitung der methanolischen FCG

Von der restlichen Lösung der methanolischen FOG-Aufarbeitung wurden 5 mL in einen 50 mL Spitzkolben pipettiert und analog der wässrigen FCG aufgearbeitet.

Fließmittel:	A: 2%ige Essigsäure B: 100 % Acetonitril
Fluss:	1 mL/min
Messwellenlänge:	340 nm
Temperatur:	20 °C
Injektionsvolumen:	50 µL
Trennsäule:	Aqua, 250 × 4,6 mm i. D. mit Vorsäulenkartusche „SecurityGuard“ C-18, 4 × 3 mm i. D. (Phenomenex®, Aschaffenburg)
Gradient:	4 % B 10 min isokratisch in 32 min auf 19 % B 8 min isokratisch mit 19 % B in 15 min auf 20 % B 5 min isokratisch mit 20 % B – Ende der Datenerfassung; 70 min in 1 min auf 100 % B 10 min isokratisch mit 100 % B

in 1 min auf 4 % B

Säule 20 min konditionieren – Methodenende:

102 min

Standards:

a) Orientin (Luteolin-8-C-glucosid), $C_{21}H_{20}O_{11}$,
 $M_r = 448,38 \text{ g/mol}$

b) Vitexin (Apigenin-8-C-glucosid), $C_{21}H_{20}O_{10}$,
 $M_r = 432,38 \text{ g/mol}$

Die Standardsubstanzen wurden zunächst in DMF gelöst und nach dem Abkühlen mit Wasser aufgefüllt. Die Verdünnungen wurden mit DMF/Wasser (2 : 3) hergestellt.

Mischstandard:

a) Orientin: 117 mg/L

b) Vitexin: 111 mg/L

Umrechnung vom Glykosid zum Aglykon:

$$EW_{(\text{Aglykon})} [\text{mg}] = \frac{EW_{(\text{Glykosid})} [\text{mg}] \cdot M_r (\text{Aglykon})}{M_r (\text{Glykosid})}$$

a) Orientin → Luteolin:

$$(117 \text{ mg/L} \times 286,24 \text{ g/mol}) / 448,38 \text{ g/mol} \\ = 74,69 \text{ mg/L Luteolin}$$

b) Vitexin → Apigenin:

$$(111 \text{ mg/L} \times 270,24 \text{ g/mol}) / 432,38 \text{ g/mol} \\ = 69,38 \text{ mg/L Apigenin}$$

Verdünnungen:

1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:100

Berechnung als Glykosid:

$$\text{Glykosid [mg/kg]} = \frac{(y-b) \cdot \text{VF} \cdot 1000}{m \cdot \text{EW}} \cdot \frac{M_r(\text{Glykosid})}{M_r(\text{Aglykon})}$$

y	Peakfläche
b	Achsenabschnitt
VF	Verdünnungsfaktor
m	Steigung
EW	Einwaage in [g]

Nachweisgrenze: Eine Orientin-Standardlösung wurde soweit verdünnt, bis die Peakhöhe dem fünffachen Grundrauschen entsprach. Diese Konzentration wurde als Nachweisgrenze festgelegt.

4.2 Identifizierung der quantitativ bestimmten Verbindungen

4.2.1 Brombeerblätter

4.2.1.1 Hydroxyzimtsäurederivate

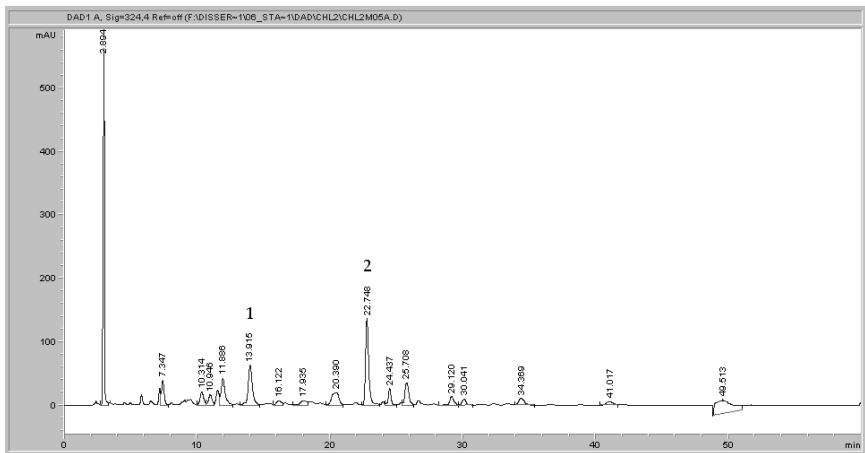


Abbildung 4.1: UV-Chromatogramm Brombeerblätter – Hydroxyzimtsäurederivate

- Peak 1 (RT = 13,9 min): UV λ_{max} : 236, 328 nm; ESI-MS (neg. Modus):
 m/z 353 = $[M - H]^+$, m/z 191 = $[M - \text{Kaffeensäure} + H_2O - H]^+$,
 m/z 173 = $[M - \text{Kaffeensäure} - H]^+$; **3-CQA**
- Peak 2 (RT = 22,7 min): UV λ_{max} : 232, 328 nm; ESI-MS (neg. Modus):
 m/z 353 = $[M - H]^+$, m/z 191 = $[M - \text{Kaffeensäure} + H_2O - H]^+$,
 m/z 179 = $[M - \text{Chinasäure} + H_2O - H]^+$; **5-CQA**

4.2.1.2 Flavonol-O-glykoside

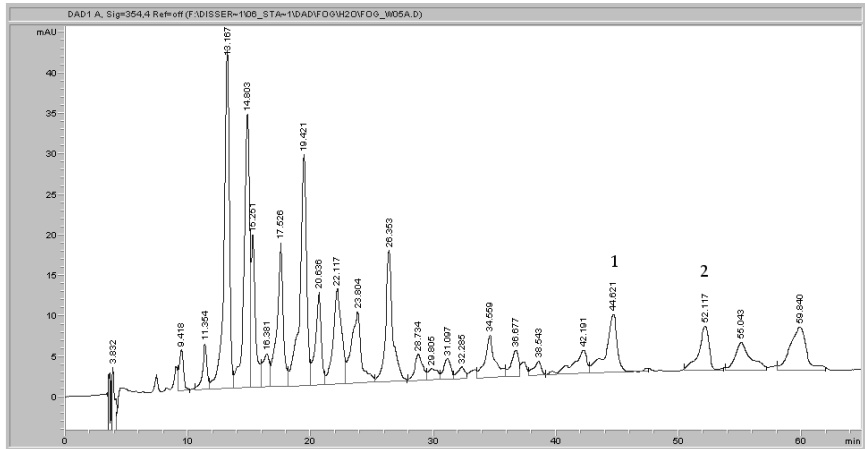


Abbildung 4.2: UV-Chromatogramm Brombeerblätter – Flavonol-O-glykoside

- Peak 1 (RT = 44,6 min): UV λ_{max} : 256, 354 nm; ESI-MS (neg. Modus): m/z 463 = $[M - H]^+$, m/z 301 = $[M - \text{Hexose} + H_2O - H]^+$;
Quercetin-glucosid oder -galactosid
- Peak 2 (RT = 52,1 min): UV λ_{max} : 266, 350 nm; ESI-MS (neg. Modus): m/z 593 = $[M - H]^+$, m/z 285 = $[M - \text{Desoxyhexose} + H_2O - H]^+$;
Kämpferol-rutinosid

4.2 Identifizierung der quantitativ bestimmten Verbindungen 121

4.2.1.3 Acide Flavonol-O-glykoside

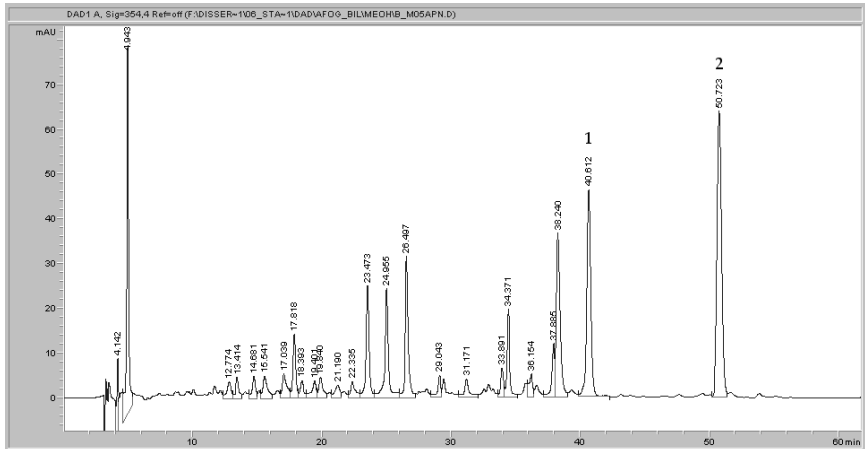


Abbildung 4.3: UV-Chromatogramm Brombeerblätter – acide Flavonol-O-glykoside

- Peak 1 (RT = 40,6 min): UV λ_{max} : 256, 354 nm; ESI-MS (neg. Modus):
 m/z 477 = $[M - H^+]$, m/z 301 = $[M - \text{Hexosesäure} + H_2O - H^+]$;
Quercetin-glucuronid oder -galacturonid
- Peak 2 (RT = 50,7 min): UV λ_{max} : 266, 348 nm; ESI-MS (neg. Modus):
 m/z 461 = $[M - H^+]$, m/z 285 = $[M - \text{Hexosesäure} + H_2O - H^+]$;
Kämpferol-glucuronid oder -galacturonid

4.2.2 Cistus incanus

4.2.2.1 Flavan-3-ole

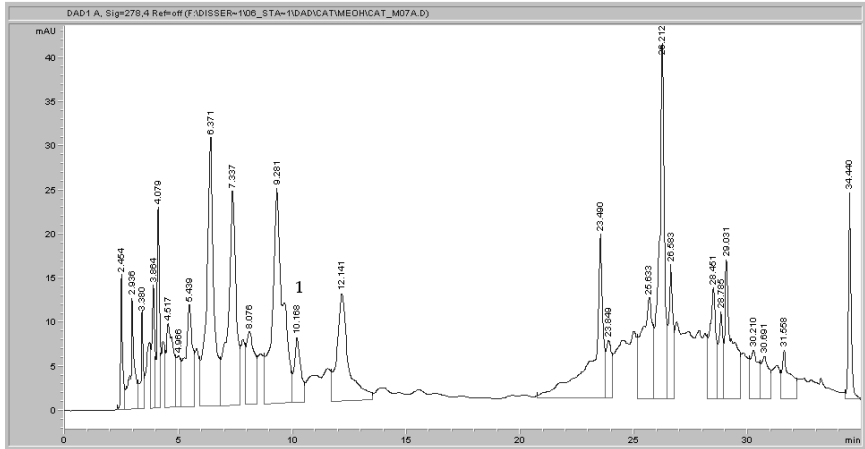


Abbildung 4.4: UV-Chromatogramm Cistus incanus – Flavan-3-ole

- Peak 1 (RT = 10,2 min): UV λ_{max} : 232, 280 nm; ESI-MS (neg. Modus): m/z 289 = $[M - H]^+$; **Catechin**

4.2 Identifizierung der quantitativ bestimmten Verbindungen 123

4.2.2.2 Flavonol-O-glykoside

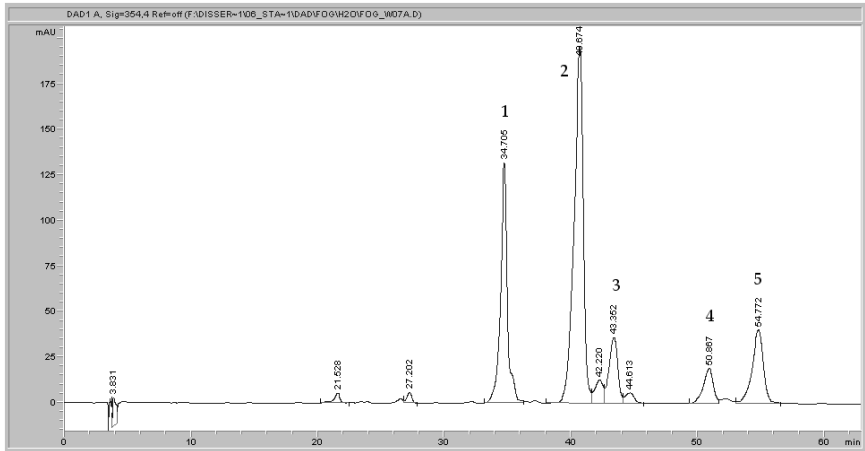


Abbildung 4.5: UV-Chromatogramm *Cistus incanus* – Flavonol-O-glykoside

- Peak 1 (RT = 34,7 min): UV λ_{\max} : 260, 358 nm; ESI-MS (neg. Modus):
 m/z 479 = $[M - H^+]$, m/z 317 = $[M - \text{Hexose} + H_2O - H^+]$;
Myricetin-galactosid (oder -glucosid)
- Peak 2 (RT = 40,7 min): UV λ_{\max} : 260, 352 nm; ESI-MS (neg. Modus):
 m/z = $[M - H^+]$, m/z 317 = $[M - \text{Desoxyhexose} + H_2O - H^+]$;
Myricetin-rhamnosid
- Peak 3 (RT = 43,4 min): UV λ_{\max} : 256, 356 nm; ESI-MS (neg. Modus):
 m/z 463 = $[M - H^+]$, m/z 301 = $[M - \text{Hexose} + H_2O - H^+]$;
Quercetin-glucosid (oder -galactosid)
- Peak 4 (RT = 50,9 min): UV λ_{\max} : 256, 356 nm; ESI-MS (neg. Modus):
 m/z 433 = $[M - H^+]$, m/z 301 = $[M - \text{Pentose} + H_2O - H^+]$;
Quercetin-pentosid (z. B. -xylosid oder -arabinsid)

- Peak 5 (RT = 54,8 min): UV λ_{max} : 258, 352 nm; ESI-MS (neg. Modus):
 m/z 447 = $[M - H]^+$, m/z 301 = $[M - \text{Desoxyhexose} + H_2O - H]^+$;
Quercetin-rhamnosid

4.2.3 Himbeerblätter

4.2.3.1 Hydroxyzimtsäurederivate

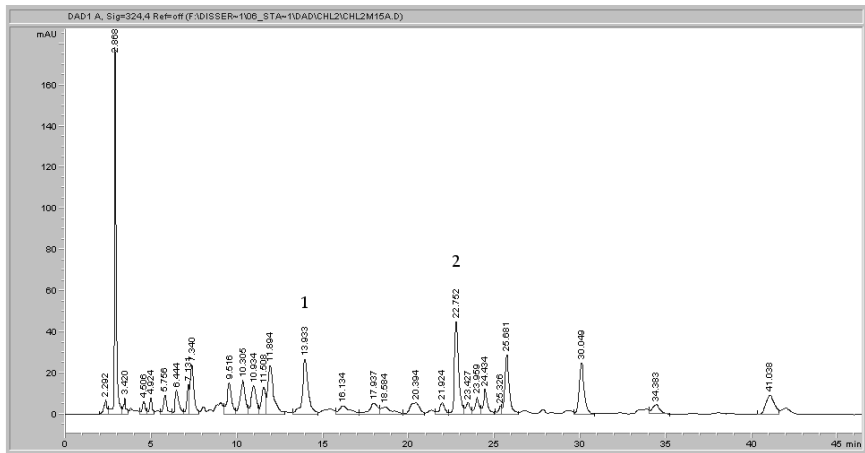


Abbildung 4.6: UV-Chromatogramm Himbeerblätter – Hydroxyzimtsäurederivate

- Peak 1 (RT = 13,9 min): UV λ_{max} : 236, 328 nm; ESI-MS (neg. Modus):
 m/z 353 = $[M - H]^+$, m/z 191 = $[M - \text{Kaffeensäure} + H_2O - H]^+$,
 m/z 173 = $[M - \text{Kaffeensäure} - H]^+$; **3-CQA**
- Peak 2 (RT = 22,8 min): UV λ_{max} : 232, 328 nm; ESI-MS (neg. Modus):
 m/z 353 = $[M - H]^+$, m/z 191 = $[M - \text{Kaffeensäure} + H_2O - H]^+$,
 m/z 179 = $[M - \text{Chinasäure} + H_2O - H]^+$; **5-CQA**

4.2 Identifizierung der quantitativ bestimmten Verbindungen 125

4.2.3.2 Flavonol-O-glykoside

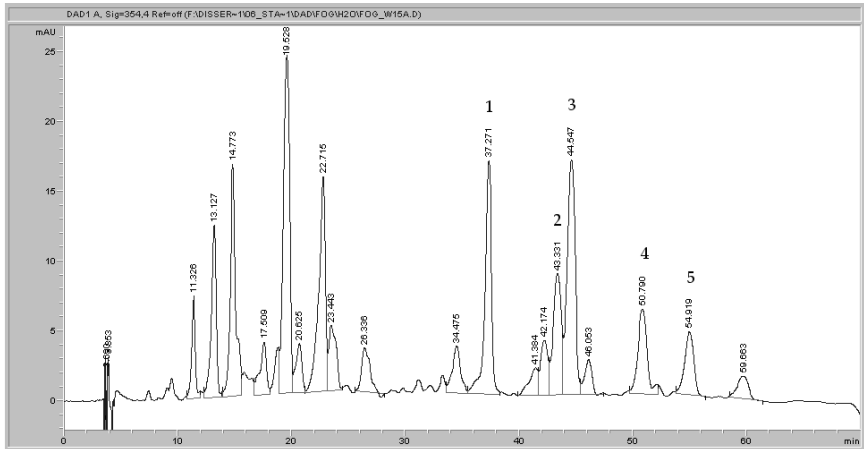


Abbildung 4.7: UV-Chromatogramm Himbeerblätter – Flavonol-O-glykoside

- Peak 1 (RT = 37,3 min): UV λ_{max} : 256, 354 nm; ESI-MS (neg. Modus):
 m/z 595 = $[M - H^+]$, m/z 463 = $[M - \text{Pentose} + H_2O - H^+]$,
 m/z 301 = $[M - \text{Pentose} - \text{Hexose} + 2 H_2O - H^+]$;
Quercetin-glucosid-pentosid oder -galactosid-pentosid
(z. B.: -xylosid)
- Peak 2 (RT = 43,3 min): UV λ_{max} : 256, 356 nm; ESI-MS (neg. Modus):
 m/z 463 = $[M - H^+]$, m/z 301 = $[M - \text{Hexose} + H_2O - H^+]$;
Quercetin-galactosid oder -glucosid
- Peak 3 (RT = 44,5 min): UV λ_{max} : 256, 354 nm; ESI-MS (neg. Modus):
 m/z 463 = $[M - H^+]$, m/z 301 = $[M - \text{Hexose} + H_2O - H^+]$;
Quercetin-glucosid oder -galactosid

- Peak 4 (RT = 50,8 min): UV λ_{\max} : 256, 354 nm; ESI-MS (neg. Modus): m/z 433 = $[M - H^+]$, m/z 301 = $[M - \text{Pentose} + H_2O - H^+]$;
Quercetin-pentosid (z. B. -xylosid oder -arabinsid)
- Peak 5 (RT = 54,9 min): UV λ_{\max} : 266, 342 nm; ESI-MS (neg. Modus): m/z 447 = $[M - H^+]$, m/z 285 = $[M - \text{Pentose} + H_2O - H^+]$;
Kämpferol-glucosid oder -galactosid

4.2.3.3 Acide Flavonol-O-glykoside

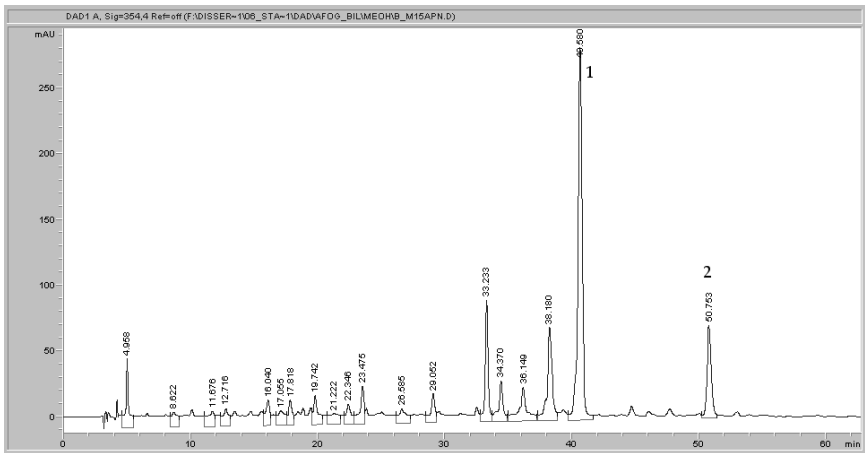


Abbildung 4.8: UV-Chromatogramm Himbeerblätter – acide Flavonol-O-glykoside

- Peak 1 (RT = 40,6 min): UV λ_{\max} : 256, 354 nm; ESI-MS (neg. Modus): m/z 477 = $[M - H^+]$, m/z 301 = $[M - \text{Hexosesäure} + H_2O - H^+]$;
Quercetin-glucuronid oder -galacturonid
- Peak 2 (RT = 50,8 min): UV λ_{\max} : 266, 348 nm; ESI-MS (neg. Modus): m/z 461 = $[M - H^+]$, m/z 285 = $[M - \text{Hexosesäure} + H_2O - H^+]$;
Kämpferol-glucuronid oder -galacturonid

4.2 Identifizierung der quantitativ bestimmten Verbindungen 127

4.2.4 Pfefferminze

4.2.4.1 Hydroxyzimtsäurederivate

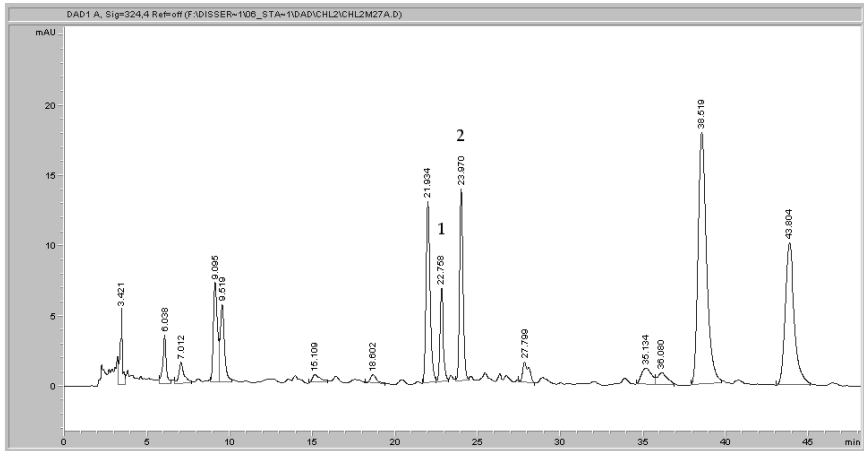


Abbildung 4.9: UV-Chromatogramm Pfefferminze – Hydroxyzimtsäurederivate

- Peak 1 (RT = 22,8 min): UV λ_{max} : 232, 328 nm; ESI-MS (neg. Modus):
 m/z 353 = $[M - H^+]$, m/z 191 = $[M - \text{Kaffeensäure} + H_2O - H^+]$,
 m/z 179 = $[M - \text{Chinasäure} + H_2O - H^+]$; **5-CQA**
- Peak 2 (RT = 24,0 min): UV λ_{max} : 232, 324 nm; ESI-MS (neg. Modus):
 m/z 353 = $[M - H^+]$, m/z 191 = $[M - \text{Kaffeensäure} + H_2O - H^+]$,
 m/z 179 = $[M - \text{Chinasäure} + H_2O - H^+]$; **4-CQA**

4.2.4.2 Rosmarinsäure

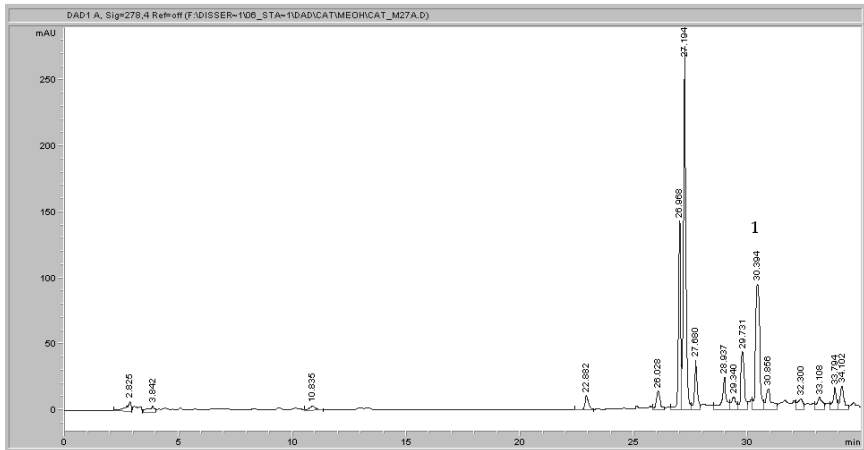


Abbildung 4.10: UV-Chromatogramm, Pfefferminze – Rosmarinsäure

- Peak 1 (RT = 30,4 min): UV λ_{max} : 242, 290, 330 nm; ESI-MS (neg. Modus): m/z 359 = $[M - H]^+$; **Rosmarinsäure**

4.2 Identifizierung der quantitativ bestimmten Verbindungen 129

4.2.4.3 Flavon- und Flavanon-O-glykoside

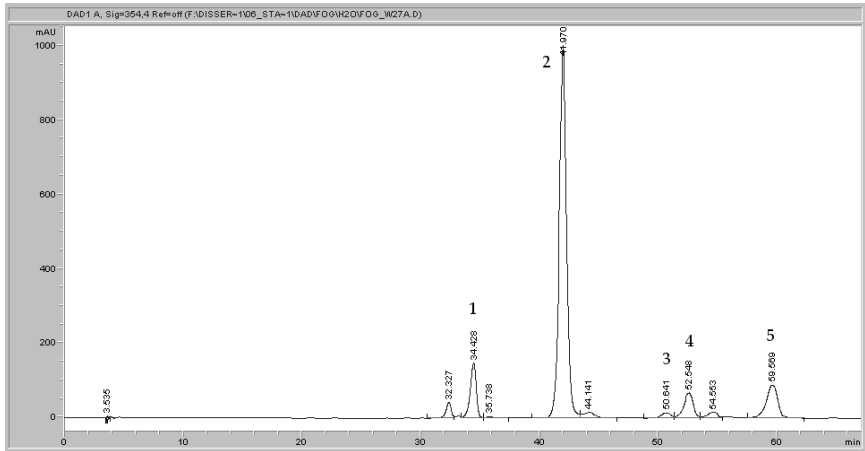


Abbildung 4.11: UV-Chromatogramm Pfefferminze – Flavon-/Flavanon-O-glykoside

- Peak 1 (RT = 34,4 min): UV λ_{max} : 232, 284 nm; ESI-MS (neg. Modus): m/z 595 = $[M - H^+]$, m/z 287 = $[M - \text{Desoxyhexose} - \text{Hexose} + 2 H_2O - H^+]$; **Eriodictyol-rutinosid**
- Peak 2 (RT = 42,0 min): UV λ_{max} : 254, 350 nm; ESI-MS (neg. Modus): m/z 593 = $[M - H^+]$, m/z 285 = $[M - \text{Desoxyhexose} - \text{Hexose} + 2 H_2O - H^+]$; **Luteolin-rutinosid**
- Peak 3 (RT = 50,6 min): UV λ_{max} : 232, 284 nm; ESI-MS (neg. Modus): m/z 609 = $[M - H^+]$, m/z 301 = $[M - \text{Desoxyhexose} - \text{Hexose} + 2 H_2O - H^+]$; **Hesperetin-rutinosid**
- Peak 4 (RT = 52,5 min): UV λ_{max} : 266, 338 nm; ESI-MS (neg. Modus): m/z 577 = $[M - H^+]$, m/z 269 = $[M - \text{Desoxyhexose} - \text{Hexose} + 2 H_2O - H^+]$; **Apigenin-rutinosid**

- Peak 5 (RT = 59,6 min): UV λ_{max} : 254, 348 nm; ESI-MS (neg. Modus): m/z 607 = $[M - H^+]$, m/z 299 = $[M - \text{Desoxyhexose} - \text{Hexose} + 2 H_2O - H^+]$; **Diosmetin-rutinosid**

4.2.4.4 Acide Flavon-O-glykoside

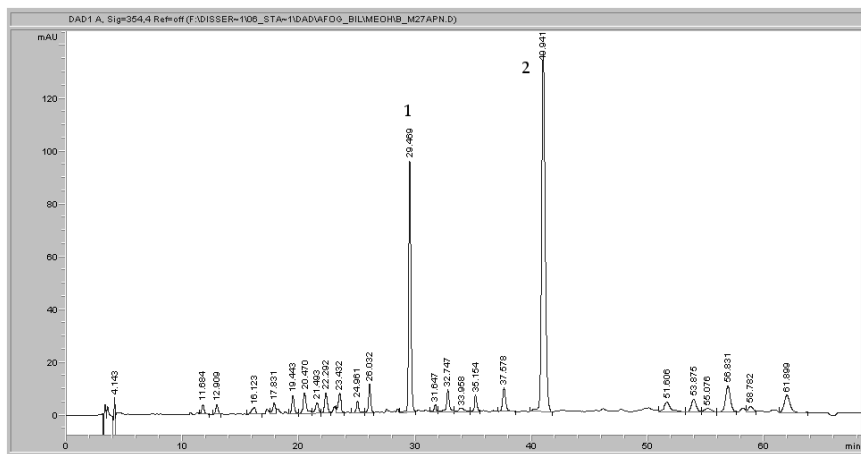


Abbildung 4.12: UV-Chromatogramm Pfefferminze – acide Flavon-O-glykoside

- Peak 1 (RT = 29,4 min): UV λ_{max} : 256, 350 nm; ESI-MS (neg. Modus): m/z 637 = $[M - H^+]$, m/z 285 = $[M - 2 \text{ Hexosesäure} + 2 H_2O - H^+]$; **Luteolin-diglucuronid**
- Peak 2 (RT = 40,9 min): UV λ_{max} : 254, 350 nm; ESI-MS (neg. Modus): m/z 461 = $[M - H^+]$, m/z 285 = $[M - \text{Hexosesäure} + H_2O - H^+]$; **Luteolin-glucuronid**

4.3 Spektroskopische Daten der isolierten Verbindungen

Luteolin-7-O- α -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucosid
(Luteolin-rutinosid) (27H1.1)

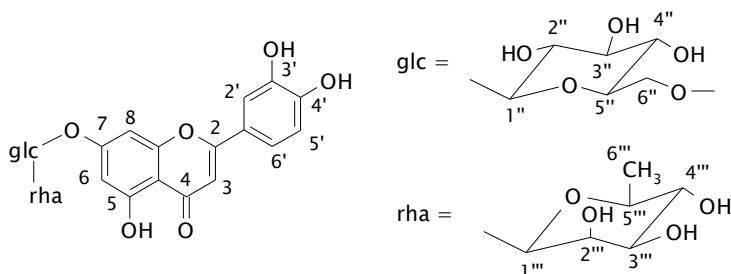


Abbildung 4.13: Struktur von 27H1.1

Ausbeute: 3,5 mg

UV (Acetonitril): λ_{\max} 254, 350 nm

ESI-MS (negativer Modus): Pseudomolekülion bei m/z 593 = $[M (594) - H^+]$; MS^2 von m/z 593 bei m/z 285 = $[M - Rha - Glc + 2 H_2O - H^+]$; MS^3 (rel. Int. %) von m/z 285 bei m/z 241 (20), 217 (14), 199 (17), 175 (21) und 151 (100)

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülion bei m/z 595 = $[M (594) + H^+]$; MS^2 von m/z 595 bei m/z 449 = $[M - Rha + H_2O + H^+]$; MS^3 von m/z 449 bei m/z 287 = $[M - Rha - Glc + 2 H_2O + H^+]$; $C_{27}H_{30}O_{15}$

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 1,07 (3H, d, $J = 6,3$ Hz, $H6'''$); 3,10-3,90 (10H, m, Zucker-H); 4,56 (1H, br s, $H1'''$); 5,06 (1H, d, $J = 7,3$ Hz, $H1''$); 6,45 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, $H6$); 6,71 (1H, s, $H3$); 6,73 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, $H8$); 6,92 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, $H5'$); 7,39-7,47 (2H, m, $H2', H6'$)

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO-d_6 , ppm): δ 17,7 ($\text{C6}'''$); 66,0 ($\text{C6}''$); 68,2 ($\text{C5}'''$); 69,5 ($\text{C4}''$); 70,2 ($\text{C2}'''$); 70,7 ($\text{C3}'''$); 72,0 ($\text{C4}''$); 73,1 ($\text{C2}''$); 75,5 ($\text{C5}''$); 76,2 ($\text{C3}''$); 94,7 (C8); 99,5 (C6); 99,9 ($\text{C1}''$); 100,4 ($\text{C1}'''$); 103,1 (C3); 105,3 (C10); 113,5 ($\text{C2}'$); 116,0 ($\text{C5}'$); 119,1 ($\text{C6}'$); 121,3 ($\text{C1}'$); 145,7 ($\text{C3}'$); 149,8 ($\text{C4}'$); 156,8 (C9); 161,2 (C5); 162,8 (C7); 164,5 (C2); 181,8 (C4)

Luteolin-7-O-diglucuronid (27H1.2)

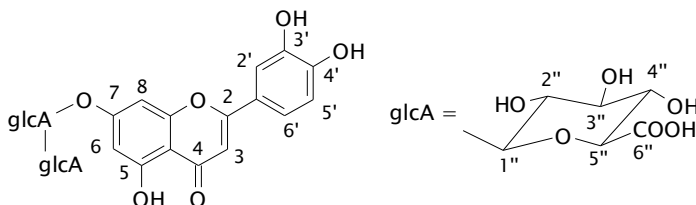


Abbildung 4.14: Struktur von 27H1.2

Ausbeute: 2,5 mg

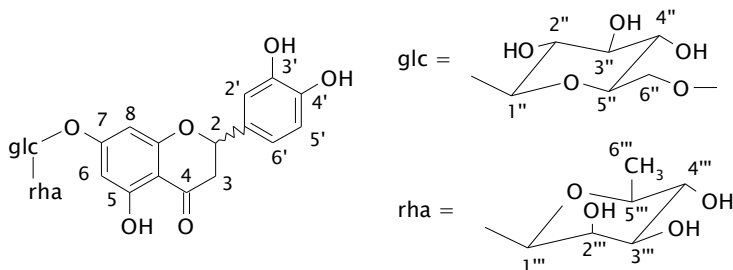
UV (Acetonitril): λ_{max} 254, 350 nm

ESI-MS (negativer Modus): Pseudomolekülon bei m/z 637 = $[\text{M} (638) - \text{H}^+]$; MS^2 von m/z 637 bei m/z 285 = $[\text{M} - 2 \text{ GlcA} + 2 \text{ H}_2\text{O} - \text{H}^+]$

ESI-MS (positiver Modus): Pseudomolekülon bei m/z 639 = $[\text{M} (638) + \text{H}^+]^+$; MS^2 von m/z 639 bei m/z 463 = $[\text{M} - \text{GlcA} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+]^+$; MS^3 von m/z 463 bei m/z 287 = $[\text{M} - 2 \text{ GlcA} + 2 \text{ H}_2\text{O} + \text{H}^+]^+$; $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{O}_{18}$

^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 3,12 -3,80 (8H, m, Zucker-H); 4,20 (1H, d, $J = 7,0$ Hz, $\text{H1}'''$); 4,57 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, $\text{H1}''$); 6,55 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H6); 6,63 (1H, s, H3); 6,86 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H8); 6,94 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, $\text{H5}'$); 7,46 (1H, dd, $J = 8,2$ Hz; 2,2 Hz, $\text{H6}'$); 7,49 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, $\text{H2}'$)

Eriodictyol-rutinosid (27H2.1)

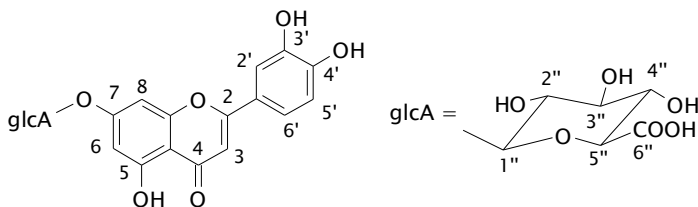
**Abbildung 4.15:** Struktur von 27H2.1

Ausbeute: 2,5 mg (verunreinigt)

UV (Acetonitril): λ_{\max} 234, 284 nm

ESI-MS (negativer Modus): Pseudomolek  n bei m/z 595 = $[M (596) - H^+]$; MS^2 von m/z 595 bei m/z 287 = $[M - Rha - Glc + 2 H_2O - H^+]$; MS^3 von m/z 287 bei m/z 151; $C_{27}H_{32}O_{15}$

Luteolin-glucuronid (27H2.2)

**Abbildung 4.16:** Struktur von 27H2.2

Ausbeute: 1,0 mg

UV (Acetonitril): λ_{\max} 254, 350 nm

ESI-MS (negativer Modus): Pseudomolekülon bei m/z 461 = $[M(462) - H^+]$; MS^2 von m/z 461 bei m/z 285 = $[M - GlcA + H_2O - H^+]$; MS^3 (rel. Int. %) von m/z 285 bei m/z 241 (21), 217 (13), 199 (17), 175 (20), 151 (100); $C_{21}H_{18}O_{12}$

**Apigenin-7-O- α -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucosid
(Apigenin-rutinosid) (27H2.3)**

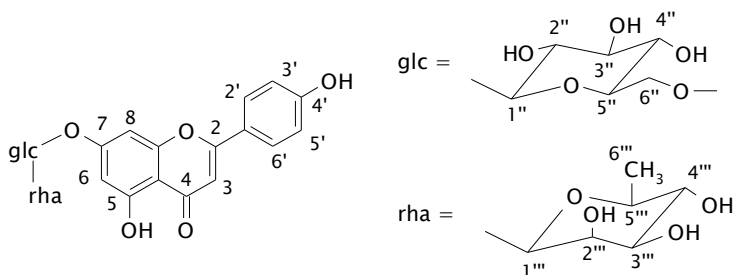


Abbildung 4.17: Struktur von 27H2.3

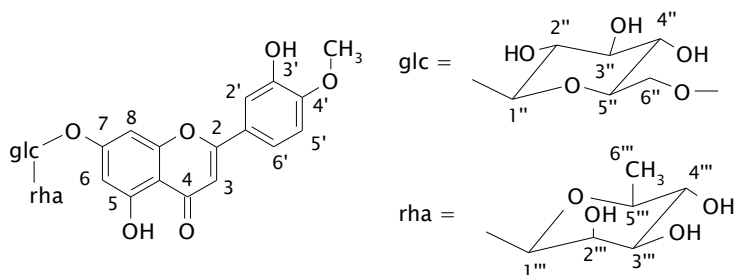
Ausbeute: 1,0 mg

UV (Acetonitril): λ_{\max} 268, 336 nm

ESI-MS (negativer Modus): Pseudomolekülon bei m/z 577 = $[M(578) - H^+]$; MS^2 von m/z 577 bei m/z 269 = $[M - Rha - Glc + 2 H_2O - H^+]$; MS^3 (rel. Int. %) von m/z 269 bei m/z 241 (13), 225 (100), 197 (36), 183 (72), 151 (22); $C_{27}H_{30}O_{14}$

1H -NMR (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 1,17 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, $H6'''$); 3,46-4,10 (10H, m, Zucker-H); 4,46 (1H, br s, $H1'''$); 5,05 (1H, d, $J = 7,4$ Hz, $H1''$); 6,53 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, $H6$); 6,66 (1H, s, $H3$); 6,78 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, $H8$); 6,96 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, $H3', H5'$); 7,89 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, $H2', H6'$)

Diosmetin-7-O-rutinosid (27H2.4)

**Abbildung 4.18:** Struktur von 27H2.4

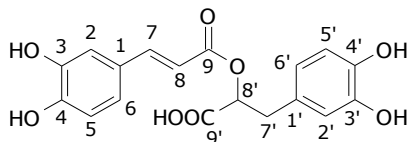
Ausbeute: 1,0 mg

UV (Acetonitril): λ_{\max} 252, 348 nm

ESI-MS (negativer Modus): Pseudomolekülon bei m/z 607 = $[M(608) - H^+]$; MS^2 von m/z 607 bei m/z 299 = $[M - Rha - Glc + 2 H_2O - H^+]$; MS^3 von m/z 299 bei m/z 285 = $[M - Rha - Glc + 2 H_2O - CH_3 - H^+]$; $C_{28}H_{32}O_{15}$

1H -NMR (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 1,25 (3H, d, $J = 6,1$ Hz, $H6'''$); 3,16-4,10 (10H, m, Zucker-H); 3,93 (3H, s, $-OCH_3$); 4,52 (1H, br s, $H1'''$); 5,00 (1H, d, $J = 7,4$ Hz, $H1''$); 6,60 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, $H6$); 6,71 (1H, s, $H3$); 6,83 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, $H8$); 7,02 (2H, m, $H2'$, $H6'$); 7,17 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, $H5'$)

Rosmarinsäure (27H3.1)

**Abbildung 4.19:** Struktur von 27H3.1

Ausbeute: 3,5 mg

UV (Acetonitril): λ_{\max} 242, 330 nm

ESI-MS (negativer Modus): Pseudomolekulation bei m/z 359 = $[M(360) - H^+]$; MS^2 (rel. Int. %) von m/z 359 bei m/z 223 (12), m/z 197 (26) = $[Kaffeesäure + H_2O - H^+]$, m/z 179 (24) = $[Kaffeesäure - H^+]$, m/z 161 (100) = $[Kaffeesäure - H_2O - H^+]$; $C_{18}H_{16}O_8$

1H -NMR (300 MHz, CD_3OD , ppm): δ 2,98 (1H, dd, $J = 8,8; 14,3$ Hz, $H7'\beta$); 3,10 (1H, dd, $J = 4,0; 14,3$ Hz, $H7'\alpha$); 5,16 (1H, dd, $J = 4,0; 8,8$ Hz, $H8'$); 6,26 (1H, d, $J = 15,9$ Hz, $H8'$); 6,62 (1H, dd, $J = 2,2; 8,1$ Hz, $H6'$); 6,69 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, $H5'$); 6,76 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, $H2'$); 6,77 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, $H5$); 6,94 (1H, dd, $J = 2,1; 8,4$ Hz, $H6$); 7,03 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, $H2$); 7,53 (1H, d, $J = 15,9$ Hz, $H8$)

^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD , ppm): δ 38,3 ($C7'$); 75,8 ($C8'$); 115,1 ($C8$); 115,3 ($C2$); 116,3 ($C5'$); 116,5 ($C5$); 117,6 ($C2'$); 121,8 ($C6'$); 123,0 ($C6$); 127,9 ($C1$); 130,1 ($C1'$); 145,1 ($C4'$); 146,1 ($C3'$); 146,8 ($C7$); 147,2 ($C3$); 149,6 ($C4$); 168,7 ($C9$); 175,0 ($C9'$)

Literaturverzeichnis

ABBOTT, T. P.; KLEIMAN, R.: Solvent selection guide for counter-current chromatography. *J. Chromatogr.* 538 (1) (1991), S. 109-118

AGRAWAL, P. K.: NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 31 (1992), S. 3307-3330

ALS: Inventarliste Lebensmitteldrogen: Stellungnahme einer ad hoc-Arbeitsgruppe des ALS. In: Ebersdobler, H. F.; Meyer, A. H. (Hrsg.): *Praxishandbuch Functional Food*. Behr's Verlag, Hamburg, 8. Akt.-Lfg. 10/2002

ANGELOPOULOU, D.; DEMETZOS, C.; PERDETZOGLOU, D.: An interpopulation study of the essential oils of *Cistus parviflorus* L. growing in Crete (Greece). *Biochem. Syst. Ecol.* 29 (4) (2001), S. 405-415

AREIAS, F. M.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; FERRERES, F.; SEABRA, R. M.: Phenolic fingerprint of peppermint leaves. *Food Chemistry* 73 (2001), S. 307-311

BANKOWSKI, C.: Quantitative variations of peppermint oil and of its component menthol in *Mentha piperita* L. and determination of ripeness of the plant. *Acta Pol. Pharm.* 10 (3) (1953), S. 169-174

BLACKWELL, E.: *Herbarium Blackwellianum*. Vol. I, Norimbergae: Typis Io. Iosephi Fleischmanni, 1750-1773

CLIFFORD, M. N.: Chlorogenic Acids. In: Clarke, R. J.; Macrae, R. (Hrsg.): *Coffee*. Volume 1: Chemistry. Elsevier Applied Science Publishers LTD, London, 1985, S. 153-202

- CLIFFORD, N. M.: *The Health Effects of Tea Compounds: Opportunities for Standardization of Research Methods*. Program of the ILSI workshop on the Health Effects of Tea Compounds; November 17-18 (1999), Washington DC, USA
- CLIFFORD, N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N.: Hierarchial Scheme for LC-MSⁿ Identification of Chlorogenic Acids. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003), S. 2900-2911
- CONWAY, W. D.: *Countercurrent chromatography: apparatus, theory, and application*. Wiley-VCH, New York, 1990
- CROZIER, A.; BURNS, J.; AZIZ, A. A.; STEWART, A. J.; RABIASZ, H. S.; JENKINS, G. I.; EDWARDS, C. A.; LEAN, M. E. J.: Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. *Biol. Res.* 33 (2) (2000), S. 79-88
- DANNE, A.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A.: Proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry* 34 (4) (1993), S. 1129-1133
- DEGENHARDT, A.: *Entwicklung und Anwendung verteilungschromatographischer Trennverfahren in der Lebensmittelanalytik*. Technische Universität Braunschweig, Dissertation, 2002
- DEGENHARDT, A.; ENGELHARDT, U. H.; LAKENBRINK, C.; WINTERHALTER, P.: Preparative Separation of Polyphenols from Tea by High-Speed Countercurrent Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000), S. 3425-3430
- DEGENHARDT, A.; HABBEN, S.; WINTERHALTER, P.: Isolation of Physiologically Active Compounds from Nutritional Beverages and Vegetables by Countercurrent Chromatography. In: Shahidi, F.; Weerasinghe, D. K. (Hrsg.): *Nutraceutical Beverages – Chemistry, Nutrition, and Health Effects*. ACS Symposium Series 871, American Chemical Society, Washington DC, USA, 2004, S. 443-456

- DEMETZOS, C.; ANASTASAKI, T.; PERDETZOGLU, D.: A chemometric interpopulation study of the essential oils of *Cistus creticus* L. growing in Crete (Greece). *Z. Naturforsch. [C]* 57 (1-2) (2002), S. 89-94
- DEMETZOS, C.; MITAKU, S.; HOTELLIER, F.; HARVALA, A.: Hétérosides polyphénoliques des feuilles de *Cistus creticus* L. [Polyphenolic glycosides from *Cistus creticus* L. leaves]. *Ann. Pharm. Fr.* 47 (5) (1989), S. 314-318
- DEROME, A. E.: *Modern NMR Techniques for chemistry research*. Pergamon Press, 6. Edition, Oxford, 1988
- DOERFFEL, K.: *Statistik in der analytischen Chemie*. Verlag Chemie, 3. Auflage, Weinheim, 1984
- DUBAND, F.; CARNAT, A. P.; CARNAT, A.; PETITJEAN-FREYTET, C.; CLAIR, G.; LAMAISON, J. L.: Composition aromatique et polyphénolique de l'infuse de Menthe, *Mentha × piperita* L. [Aromatic and polyphenolic composition of infused peppermint, *Mentha × piperita* L.]. *Ann. Pharm. Fr.* 50 (3) (1992), S. 146-155
- DUGO, P.; MONDELLO, L.; ERRANTE, G.; ZAPPÀ, G.; DUGO, G.: Identification of Anthocyanins in Berries by Narrow-Bore High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Detection. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001), S. 3987-3992
- ENGELHARDT, U. H.; FINGER, A.; HERZIG, B.: Untersuchungen über Polyphenole im Tee mittels HPLC: Hydroxyzimtsäurederivate. *Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem.* 43 (1989), S. 58-59
- ENGELHARDT, U. H.; FINGER, A.; HERZIG, B.; KUHR, S.: Determination of Flavonol Glycosides in Black Tea. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 88 (1992), S. 69-73

- ENGELHARDT, U. H.; FINGER, A.; KUHR, S.: Determination of Flavone C-Glycosides in Tea. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 197 (1993), S. 239-244
- FABRE, N.; RUSTAN, I.; DE HOFFMANN, E.; QUETIN-LECLERCQ, J.: Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12 (6) (2001), S. 707-715
- FINGER, A.: *Flavonol- und Flavonglykoside des Tees*. Technische Universität Braunschweig, Dissertation, 1991
- FRIEBOLIN, H.: *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*. VCH, Weinheim, 1988
- GROSS, G. G.: Carboxylaktivierte Zimtsäuren – Zentrale Intermediärprodukte des pflanzlichen Phenolstoffwechsels. *GIT Fachz. Lab.* 7 (1986), S. 691-696
- GUÉDON, D. J.; PASQUIER, B. P.: Analysis and Distribution of Flavonoid Glycosides and Rosmarinic Acid in 40 *Mentha × piperita* Clones. *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994), S. 679-684
- HELLER, W.; FORKMANN, G.: Biosynthesis. In: Harborne, J. B. (Hrsg.): *The Flavonoids – Advances in Research since 1980*. Chapman and Hall, London, New York, 1988, S. 399-425
- HENN, T.; STEHLE, P.: Gesamtphenolgehalt und antioxidative Kapazität handelsüblicher Getränke. *Ernährungs-Umschau* 45 (9) (1998), S. 308-313
- HENNING, W.: Flavonolglykoside der Erdbeeren (*Fragaria × ananassa* Duch.), Himbeeren (*Rubus idaeus* L.) und Brombeeren (*Rubus fruticosus* L.) *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 173 (1981), S. 180-187

- HERRMANN, K.: Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren enthaltende Naturstoffe in Pflanzen. *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe* 35 (1978), S. 73-132
- HÖRHAMMER, L.; WAGNER, H.: Polyamidchromatographie. *Pharm. Zeitg.* 104 (1959), S. 783-786
- ISO/CD 14502-1: Determination of total polyphenols in tea – Part 1: Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent.
- ITO, Y.: *High-speed countercurrent chromatography*. Wiley, New York, 1996
- IUPAC: Nomenclature of cyclitols. *Biochem. J.* 153 (1976), S. 23-31
- JACQUIN, N. J.: *Icones Plantarum Rariorum*. Vol. I, Vindobonae: C. F. Wappeler; Londini: B. White et filium; Lugduni Batavorum: S. et J. Luchtmans; Argentorati: A. König, 1781–1793
- JIAO, H.; WANG, S. Y.: Correlation of Antioxidant Capacities to Oxygen Radical Scavenging Enzyme Activities in Blackberry. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000), S. 5672-5676
- KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; HEINONEN, M.: Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001), S. 4076-4082
- KASAJ, D.; KRENN, L.; REZNICEK, G.; PRINZ, S.; HÜFNER, A.; KOPP, B.: Flavonoids in *Achillea collina*. *Sci. Pharm.* 69 (2001), S. 75-83
- KÖHLER, F. E.: *Köhler's Medizinal-Pflanzen*. Vol. I, Gera-Untermhaus, 1883–1914
- KUHNT, M.; RIMPLER, H.; HEINRICH, M.: Lignans and other Compounds from the Mixe Indian Medicinal Plant *Hyptis verticillata*. *Phytochemistry* 36 (2) (1994), S. 485-489

- KUHR, S.: *Flavanole, Flavon-C-glykoside und höhermolekulare Polyphenole im Tee*. TU Braunschweig, Dissertation, 1993
- LEITSÄTZE FÜR TEE, TEEÄHNLICHE ERZEUGNISSE, DEREN EXTRAKTE UND ZUBEREITUNGEN. In der Fassung vom 2. Dezember 1998; Bek. v. 26. 1. 1999 (GMBL. S. 228)
- LU, Y.; FOO, Y.: Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* 55 (2000), S. 263-267
- MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R. B.: Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100 (24) (2003), S. 14481-14486
- METZNER, H.: *Biochemie der Pflanzen*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1973
- MILLER, A. L.: Antioxidant Flavonoids: Structure, Function and Clinical Usage. *Alt. Med. Rev.* 1 (2) (1996), S. 103-111
- MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A.: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84 (1993), S. 407-412
- MIMICA-DUKIC, N.; BOZIN, B.; SOKOVIC, M.; MIHAJLOVIC, B.; MATAVULJ, M.: Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Med.* 69 (5) (2003), S. 413-419
- MITCHELL, K. A.; MARKHAM, K. R.; BAYLY, M. J.: Flavonoid characters contributing to the taxonomic revision of the *Hebe parviflora* complex. *Phytochemistry* 56 (2001), S. 453-461

- MOYER, R. A.; HUMMER, K. E.; FINN, C. E.; FREI, B.; WROLSTAD, R. E.: Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002), S. 519-525
- OKA, F.; OKA, H.; ITO, Y.: Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr.* 538 (1) (1991), S. 99-108
- PAGANGA, G.; MILLER, N.; RICE-EVANS, C. A.: The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? *Free Radic. Res.* 30 (2) (1999), S. 153-162
- PETEREIT, F.; KOLODZIEJ, H.; NAHRSTEDT, A.: Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry* 30 (3) (1991), S. 981-985
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26 (9-10) (1999), S. 1231-1237
- RECHNER, A.; PATZ, C.-D.; DIETRICH, H.: Beitrag zur Bewertung der antioxidativen Kapazität verschiedener Getränke. *Flüssiges Obst* 64 (1997), S. 62-65
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G.: Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996), S. 933-956
- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G.: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130 (2000), S. 2073S-2085S
- SCHNEIDER, G.; HILLER, H.: *Arzneidrogen*. Spektrum Akademischer Verlag, 4. Auflage, Heidelberg, Berlin, 1999

- SCHORMÜLLER, J.: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer-Verlag, 2. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York, 1974
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.: Analysis of total phenolics and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Lester Packer (Hrsg.): *Methods in Enzymology. Oxidants and Antioxidants, Part A*. Academic Press, San Diego, 1999 (299), S. 152-178
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 16 (3) (1965), S. 144-158
- SOUCL, S. W.; FACHMANN, W.; KAUT, H.: *Die Zusammensetzung der Lebensmittel – Nährwert-Tabellen 1986/87*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1986
- STOCHMAL, A.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; DE RICCARDIS, F.; LEITZ, R.; OLESZEK, W.: Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Flavonoids. 1. Apigenin and Luteolin Glycosides from Aerial Parts. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001), S. 753-758
- STREIT, H.: Lebensmittel oder Arzneimittel? – Möglichkeiten einer Abgrenzung. *Internistische Praxis* 41 (2) (2001), S. 449-462
- THOMÉ, O. W.: *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. Gera-Untermhaus, 1885–1905
- WANG, M.; SIMON, J. E.; AVILES, I. F.; HE, K.; ZHENG, Q.-Y.; TADMOR, Y.: Analysis of Antioxidative Phenolic Compounds in Artichoke (*Cynara scolymus* L.) *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003), S. 601-608
- WANG, S. Y.; LIN, H.-S.: Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000), S. 140-146

- WATERHOUSE, A. L.: Wine Phenolics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 957 (2002), S. 21-36
- WATZL, B.; LEITZMANN, C.: *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1999
- WICHTL, M. (Hrsg.): *Teedrogen und Phytopharmaka*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 4. Auflage, Stuttgart, 2002
- WIRTSCHAFTSVEREINIGUNG KRÄUTER- UND FRÜCHTETEE E.V. (WKF): Kräuter- und Früchtetee mit Rekordplus – Marktbericht 2003. (2004)
- WIRTSCHAFTSVEREINIGUNG KRÄUTER- UND FRÜCHTETEE E.V. (WKF): Inventarliste Lebensmitteldrogen. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 95 (5) (2000), S. 172-176
- WISEMAN, S. A.; BALENTINE, D. A.; FREI, B.: Antioxidants in Tea. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37 (8) (1997), S. 705-718
- YOSHIDA, K.; KAMEDA, K.; KONDO, T.: Diglucuronoflavones from Purple Leaves of *Perilla ocimoides*. *Phytochemistry* 33 (4) (1993), S. 917-919

Anhang

A.I Extrahierbare Feststoffe

Tabelle A.I.1: Extrahierbare Feststoffe (TSS; 10 g Probe/L Wasser, 10 min Ziehzeit)

Produkt	TSS [g/L]	Probe	TSS [g/L]
Anis	2,30	Mateblätter, grün	3,36
Apfel (sauer)	4,86	Melissenblätter	2,51
Apfel (wild)	6,28	Orangenblätter	3,50
Aroniabeeren	5,20	Orangenblüten	4,86
Brombeerblätter	2,66	Orangenschalen	3,61
Brombeerstücke, getr.	10,11	Pfefferminze	2,54
Cistus incanus	1,70	Rooibos	1,16
Eisenkraut	2,90	Rosmarinblätter	2,13
Fenchel	1,43	Rotes Weinlaub	3,22
Ginkgoblätter	2,89	Schwarztee	2,42
Ginsengwurzel	3,47	Silberlindenblüten	1,57
Grüntee	2,95	Sonnenhutkraut	2,60
Hagebutte	4,11	Süßholzwurzel geschn.	2,07
Hibiscus	4,66	Süßholzwurzel, nat.	2,19
Himbeerblätter	1,91	Süßkraut	3,49
Holunderbeeren	3,88	Taigawurzel	0,31
Hopfenzapfen	3,07	Weißdornblätter/-blüten	2,44
Johannisbeeren, schw.	2,30	Zimt (Korinth)	1,25
Kamillenblüten	3,17	Zimtrinde	1,14
Lapachorinde	0,53	Zitronengras	2,31
Lindenblüten	1,84	Zitronenschalen	3,80

A.II Antioxidative Aktivität

Tabelle A.II.1: Antioxidative Aktivität der methanolischen und wässrigen Extrakte sowie der extrahierbaren Feststoffe (TSS)

Produkt	mmol Trolox [®] /g Einwaage (MeOH-Extrakt)	mmol Trolox [®] /g Einwaage (H ₂ O-Extrakt)	mmol Trolox [®] /g TSS (H ₂ O-Extrakt)
Anis	0,08	0,07	0,32
Apfel (sauer)	0,15	0,09	0,18
Apfel (wild)	0,10	0,07	0,11
Aroniabeeren	0,28	0,14	0,26
Brombeerblätter	0,57	0,52	1,97
Brombeerstücke, getr.	0,09	0,07	0,07
Cistus incanus	0,90	0,39	2,28
Eisenkraut	0,34	0,23	0,78
Fenchel	0,05	0,03	0,20
Ginkgoblätter	0,17	0,08	0,29
Ginsengwurzel	0,03	0,02	0,06
Grüntee	1,42	0,74	2,49
Hagebutte	0,51	0,34	0,82
Hibiscus	0,14	0,10	0,22
Himbeerblätter	0,58	0,35	1,84
Holunderbeeren	0,22	0,13	0,35
Hopfenzapfen	0,26	0,23	0,77
Johannisbeeren, schw.	0,03	0,04	0,18
Kamillenblüten	0,14	0,16	0,50
Lapachorinde	0,04	0,02	0,30
Lindenblüten	0,49	0,33	1,79
Mateblätter, grün	0,58	0,56	1,66

Produkt	mmol Trolox [®] /g	mmol Trolox [®] /g	mmol Trolox [®] /g
	Einwaage (MeOH-Extrakt)	Einwaage (H ₂ O-Extrakt)	TSS (H ₂ O-Extrakt)
Melissenblätter	0,67	0,65	2,61
Orangenblätter	0,13	0,20	0,57
Orangenblüten	0,12	0,10	0,21
Orangenschalen	0,11	0,06	0,16
Pfefferminze	0,20	0,19	0,75
Rooibos	0,56	0,24	2,10
Rosmarinblätter	0,39	0,33	1,56
Rotes Weinlaub	0,31	0,27	0,83
Schwarztee	0,97	0,44	1,80
Silberlindenblüten	0,48	0,17	1,09
Sonnenhutkraut	0,08	0,09	0,35
Süßholzwurzel geschn.	0,10	0,05	0,24
Süßholzwurzel, nat.	0,14	0,06	0,29
Süßkraut	0,22	0,21	0,61
Taigawurzel	0,04	0,03	1,04
Weißdornblätter/-blüten	0,39	0,28	1,13
Zimt (Korinth)	1,41	0,40	3,23
Zimtrinde	1,45	0,37	3,21
Zitronengras	0,14	0,06	0,27
Zitronenschalen	0,16	0,07	0,19

A.III Gesamtphenolgehalte

Tabelle A.III.1: Gesamtphenolgehalte (TPP; Gallussäure-Äquivalente) der methanolischen und wässrigen Extrakte und der extrahierbaren Feststoffe (TSS)

Produkt	TPP in % Einwaage (MeOH-Extrakt)	TPP in % Einwaage (H ₂ O-Extrakt)	TPP in % TSS (H ₂ O-Extrakt)
Anis	1,52	1,09	4,73
Apfel (sauer)	2,20	1,66	3,41
Apfel (wild)	1,75	1,47	2,34
Aroniabeeren	4,26	2,94	5,66
Brombeerblätter	10,72	7,14	26,82
Brombeerstücke, getr.	1,12	0,97	0,96
Cistus incanus	10,48	4,01	23,51
Eisenkraut	4,83	4,03	13,90
Fenchel	0,76	0,41	2,87
Ginkgoblätter	2,97	1,46	5,04
Ginsengwurzel	0,35	0,24	0,70
Grüntee	14,29	7,14	24,16
Hagebutte	8,16	4,35	10,59
Hibiscus	2,76	1,89	4,06
Himbeerblätter	8,45	4,17	21,81
Holunderbeeren	4,05	1,56	4,01
Hopfenzapfen	2,98	2,58	8,40
Johannisbeeren, schw.	0,58	0,64	2,78
Kamillenblüten	2,72	2,11	6,65
Lapachorinde	0,93	0,42	7,83
Lindenblüten	8,24	3,77	20,53

Produkt	TPP in %	TPP in %	TPP in %
	Einwaage (MeOH-Extrakt)	Einwaage (H ₂ O-Extrakt)	TSS (H ₂ O-Extrakt)
Mateblätter, grün	12,72	8,63	25,72
Melissenblätter	10,46	7,83	31,19
Orangenblätter	3,06	2,96	8,44
Orangenblüten	2,50	2,16	4,45
Orangenschalen	2,10	0,98	2,70
Pfefferminze	3,87	3,10	12,18
Rooibos	9,22	3,46	29,76
Rosmarinblätter	7,18	4,86	22,81
Rotes Weinlaub	6,64	3,75	11,66
Schwarztee	13,93	5,21	21,56
Silberlindenblüten	1,47	2,45	15,62
Sonnenhutkraut	1,65	1,72	6,61
Süßholzwurzel geschn.	2,20	1,28	6,17
Süßholzwurzel, nat.	2,67	1,33	6,08
Süßkraut	4,53	3,53	10,12
Taigawurzel	0,79	0,43	14,06
Weißdornblätter/-blüten	6,54	3,54	14,51
Zimt (Korinth)	17,83	6,52	52,23
Zimtrinde	10,88	5,33	46,89
Zitronengras	1,34	0,87	3,76
Zitronenschalen	2,14	1,50	3,96

A.IV Versuche zur Lagerstabilität

Tabelle A.IV.1: Änderung der antioxidativen Aktivität während der Lagerung unter verschiedenen Bedingungen

mmol Trolox [®] /g Einwaage (methanolischer Extrakt)						
Monate	0	3	6	9	15	18
Tiefkühlraum (– 18 °C)						
Brombeerblätter	1,07			1,11		1,16
Cistus incanus	1,21			1,08		1,00
Himbeerblätter	0,63			0,61		0,66
Pfefferminze	0,26			0,29		0,34
Erhöhte Temperatur (40 °C)						
Brombeerblätter	1,20	1,21		1,13		
Cistus incanus	1,15	1,03		0,98		
Himbeerblätter	0,69	0,65		0,71		
Pfefferminze	0,32	0,29		0,37		
Raumtemperatur (diffuses Tageslicht)						
Brombeerblätter	1,07	1,09		1,04	0,00	
Cistus incanus	1,21	1,01		1,01	0,00	
Himbeerblätter	0,63	0,68		0,59	0,00	
Pfefferminze	0,26	0,34		0,30	0,00	
Raumtemperatur (dunkel)						
Brombeerblätter	1,07		0,97	1,20		1,08
Cistus incanus	1,21		0,98	1,14		1,12
Himbeerblätter	0,63		0,54	0,69		0,79
Pfefferminze	0,26		0,26	0,32		0,40

A.V Extraktionsversuche

Tabelle A.V.1: Lösliche Feststoffe in Prozent bezogen auf Einwaage
(Pfefferminze)

Zeit [min]	40 °C	60 °C	80 °C	95 °C
1	13,8	18,5	22,0	23,6
2	17,7	21,5	24,8	25,7
3	19,8	23,3	25,9	26,7
5	21,9	24,7	27,3	28,0
10	24,4	26,6	28,9	29,6
15	24,6	27,7	29,5	30,3
30	26,0	28,6	30,5	31,9

Tabelle A.V.2: Antioxidative Aktivität in mmol Trolox[®]/g Einwaage
(Pfefferminze)

Zeit [min]	40 °C	60 °C	80 °C	95 °C
1	0,11	0,13	0,21	0,23
2	0,13	0,17	0,25	0,28
3	0,14	0,21	0,27	0,29
5	0,16	0,23	0,30	0,32
10	0,18	0,29	0,33	0,34
15	0,19	0,28	0,33	0,35
30	0,20	0,30	0,35	0,38

A.VI Trockenmassen

Produkt	Trockenmasse [%]
Brombeerblätter	92,6
Cistus incanus	92,9
Himbeerblätter	93,1
Pfefferminze	91,3

A.VII Vergleich der antioxidativen Aktivität

Tabelle A.VII.1: Vergleich der ermittelten Ergebnisse (kursiv) mit Daten von Henn und Stehle (1998)

Produkt	TEAC mmol Trolox®/L	TPP GAE [mg/L]	Produkt	TEAC mmol Tro- lox®/L	TPP GAE [mg/L]
Rotweine, Spanien	15,50	2025	<i>Rotes Weinlaub</i>	2,67	375
Grüntee	14,60	1562	<i>Rooibos</i>	2,44	346
Schwarztee, Darjeling	14,30	1417	<i>Hopfenzapfen</i>	2,35	258
Rotweine, Frankreich	14,20	2004	<i>Eisenkraut</i>	2,26	403
Schwarztee, Assam	13,00	1590	<i>Süßkraut</i>	2,13	353
Schwarztee, Ceylon	12,90	1596	Weißweine	2,00	279
Rotweine, USA	12,20	1744	<i>Orangenblätter</i>	1,98	296
Rotweine, Deutschland	11,60	1634	<i>Pfefferminze</i>	1,91	310
Rotweine, Italien	11,60	1616	<i>Silberlindenblüten</i>	1,71	319
Schwarztee (Broken)	10,80	968	Apfelsaft	1,70	424
Johannisbeernektar	9,60	1429	<i>Kamillenblüten</i>	1,60	211
<i>Grüntee</i>	7,35	714	<i>Aroniabeeren</i>	1,37	294
<i>Melissenblätter</i>	6,54	783	<i>Holunderbeeren</i>	1,34	156

Produkt	TEAC mmol Trolox®/L	TPP GAE [mg/L]	Produkt	TEAC mmol Tro- lox®/L	TPP GAE [mg/L]
<i>Mateblätter, grün</i>	5,59	863	<i>Hibiscus</i>	1,03	189
<i>Brombeerblätter</i>	5,23	714	<i>Orangenblüten</i>	1,01	216
<i>Traubensaft, rot</i>	4,70	1070	<i>Sonnenhutkraut</i>	0,92	201
<i>Schwarztee</i>	4,36	767	<i>Apfel (sauer)</i>	0,88	166
<i>Zimt (Korinth)</i>	4,03	652	<i>Ginkgoblätter</i>	0,83	146
<i>Oolong-Tee</i>	4,00	631	<i>Zitronenschalen</i>	0,73	150
<i>Cistus incanus</i>	3,87	401	<i>Anis</i>	0,73	109
<i>Zimtrinde</i>	3,65	533	<i>Brombeerstücke</i>	0,70	97
<i>Himbeerblätter</i>	3,51	417	<i>Apfel (wild)</i>	0,66	147
<i>Multivitaminsaft</i>	3,50	734	<i>Süßholzwurzel</i>	0,63	133
<i>Hagebutte</i>	3,38	435	<i>Zitronengras</i>	0,61	94
<i>Rosmarinblätter</i>	3,32	486	<i>Orangenschalen</i>	0,59	98
<i>Grapefruitsaft</i>	3,30	836	<i>Süßholzwurzel, geschn.</i>	0,50	128
<i>Lindenblüten</i>	3,29	377	<i>Johannisbeeren</i>	0,42	68
<i>Orangensaft</i>	3,00	751	<i>Taigawurzel</i>	0,32	43
<i>Roséweine</i>	2,90	420	<i>Fenchel</i>	0,29	41
<i>Vitamin A,C,E-Saft</i>	2,90	373	<i>Ginsengwurzel</i>	0,20	24
<i>Weißdornblätter/-blüten</i>	2,77	354	<i>Lapachorinde</i>	0,16	42

A.VIII Untersuchte Stoffklassen

Flavan-3-ole

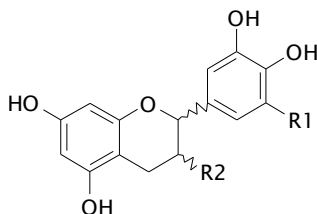
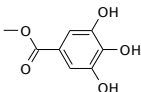
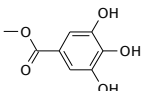


Abbildung A.VIII.1: Grundstruktur der Flavan-3-ole (Catechine)

Tabelle A.VIII.1: Substitutionsmuster und relative Molekülmassen von Flavanolen

Name	R1	R2	M _r [g/mol]
Catechin/Epicatechin	H	OH	290
Gallocatechin/Epigallocatechin	OH	OH	306
Catechingallat/ Epicatechingallat	H		442
Gallocatechingallat/ Epigallocatechingallat	OH		458

Hydroxyzimtsäurederivate

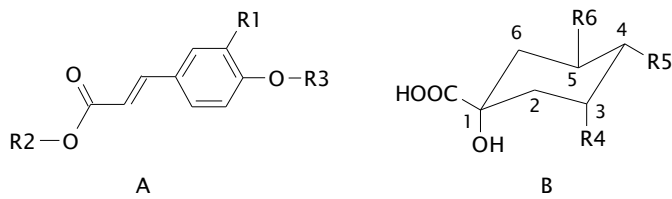


Abbildung A.VIII.2: Grundstruktur der Hydroxyzimtsäurederivate

Tabelle A.VIII.2: Substitutionsmuster und relative Molekülmassen von Hydroxyzimtsäurederivaten (R4 bis R6 = A über R2 verknüpft oder OH)

Name	R1	R2	R3	M _r [g/mol]
3/4/5-CouQA	H	B	H	338
3/4/5-CQA	OH	B	H	354
3/4/5-FQA	OCH ₃	B	H	368
3,4/3,5/4,5-diCouQA	H, H	B	H	484
3,4/3,5/4,5-diCQA	OH, OH	B	H	516
3,4/3,5/4,5-diFQA	OCH ₃ , OCH ₃	B	H	544
Cumaroyl-CaffeoylQA	H, OH	B	H	500
Cumaroyl-FeruloylQA	H; OCH ₃	B	H	514
Caffeoyl-FeruloylQA	OH; OCH ₃	B	H	530
Cumaroylglucose Cumarsäureglucosid	H	D-Glucose H	H D-Glucose	326
Caffeoylglucose Kaffeesäureglucosid	OH	D-Glucose H	H D-Glucose	342
Feruloylglucose Ferulasäureglucosid	OCH ₃	D-Glucose H	H D-Glucose	356

Rosmarinsäure

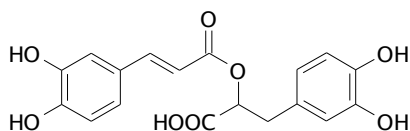


Abbildung A.VIII.3: Struktur der Rosmarinsäure ($M_r = 360 \text{ g/mol}$)

Flavanone

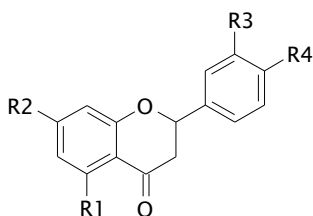
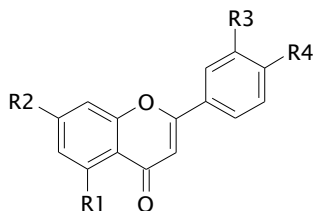


Abbildung A.VIII.4: Grundstruktur der Flavanone

Tabelle A.VIII.3: Substitutionsmuster und relative Molekülmassen von Flavanonen

Name	R1	R2	R3	R4	M_r [g/mol]
Flavanon	H	H	H	H	224
Naringenin	OH	OH	H	OH	272
Eriodictyol	OH	OH	OH	OH	288
Isosakuranetin	OH	OH	H	OCH ₃	286
Sakuranetin	OH	OCH ₃	H	OH	286
Hesperetin	OH	OH	OH	OCH ₃	302

Flavone

**Abbildung A.VIII.5:** Grundstruktur der Flavone**Tabelle A.VIII.4:** Substitutionsmuster und relative Molekülmassen von Flavonen

Name	R1	R2	R3	R4	M _r [g/mol]
Flavon	H	H	H	H	222
7-Hydroxyflavon	H	OH	H	H	238
Chrysin	OH	OH	H	H	254
Genkwanin	H	OCH ₃	H	OH	284
Apigenin	OH	OH	H	OH	270
Luteolin	OH	OH	OH	OH	286
Diosmetin	OH	OH	OH	OCH ₃	300
Chrysoeriol	OH	OH	OCH ₃	OH	300

Flavonole

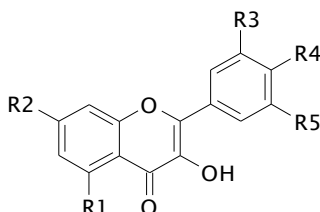


Abbildung A.VIII.6: Grundstruktur der Flavonole

Tabelle A.VIII.5: Substitutionsmuster und relative Molekülmassen von Flavonolen

Name	R1	R2	R3	R4	R5	M _r [g/mol]
Galengin	OH	OH	H	H	H	270
Kämpferol	OH	OH	H	OH	H	286
Fisetin	H	OH	OH	OH	H	286
Kämpferid	OH	OH	H	OCH ₃	H	300
Quercetin	OH	OH	OH	OH	H	302
Rhamnetin	OH	OCH ₃	OH	OH	H	316
Isorhamnetin	OH	OH	OCH ₃	OH	H	316
Myricetin	OH	OH	OH	OH	OH	318

Zucker-Bausteine

Folgende Zucker-Bausteine kommen häufig als O- oder C-Glykoside der Flavonole und Flavone vor. Da die Knüpfung der glykosidischen Bindung unter Abspaltung eines H₂O-Moleküls stattfindet, muss zur Berechnung der relativen Molekülmasse des Glykosids für jeden Zucker-Baustein die Masse eines Moleküls Wassers subtrahiert werden:

$$M_{r(\text{Glykosid})} = M_{r(\text{Aglykon})} + (M_{r(\text{Zucker})} - 18)$$

Tabelle A.VIII.6: Relative Molekülmassen der glykosidisch gebundenen Zucker

Zucker	M_r [g/mol]
Pentosen (Ribose, Arabinose, Xylose, Lyxose)	150
Hexosen (Glucose, Galactose, Mannose, etc.)	180
Rhamnose (Desoxy-Mannose)	164
Glucuronsäure/Galacturonsäure	194
Rutinosen (Rhamnose-Glucose)	326
Glucose-Rhamnose-Glucose	488

